



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOSANA MARIA MESSIAS

**PRODUÇÃO DE LIPASES POR *Botryosphaeria ribis* EC-01
EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO**

Londrina
2008

JOSANA MARIA MESSIAS

**PRODUÇÃO DE LIPASES POR *Botryosphaeria ribis* EC-01
EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Aneli de Melo
Barbosa
Co-orientadora: Profa. Dra. Valéria Marta
Gomes de Lima

Londrina
2008

JOSANA MARIA MESSIAS

**PRODUÇÃO DE LIPASES POR *Botryosphaeria ribis* EC-01
EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Nadia Krieger
UFPR – Curitiba - PR

Londrina, 25 de Setembro de 2008.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida;

Ao querido Ricardo Luís Yoshida, por ter sido o primeiro a acreditar na realização deste sonho;

À minha família, à minha irmã Cinara Grasiela, em especial aos meus pais José Carlos e Ana Maria, pelo apoio e orações;

À família Yoshida, pelo acolhimento, apoio e amizade;

À Profa. Aneli de Melo Barbosa, pela dedicação, experiência, profissionalismo, orientação e amizade no decorrer deste trabalho. Também a agradeço muitíssimo, pelos ótimos momentos que desde já se tornam nostálgicos;

À Profa. Valéria Marta Gomes de Lima, pela amizade, paciência e generosidade em ceder seus conhecimentos sobre o tema desta dissertação. Sou também muito grata pela hospitalidade curitibana que recebi de sua família;

Ao Prof. Robert Dekker, pelo voto de confiança, amizade e pelas valiosas sugestões, mesmo que à distância. Também o agradeço muito, pela grandiosa ajuda e motivação na elaboração de artigo científico;

À Profa. Maria Inês Rezende, pela amizade e pela disponibilidade em me ouvir e sempre me acalmar nos momentos difíceis;

À Profa. Ieda S. Scarminio, pelos ensinamentos e esclarecimentos pertinentes à metodologia estatística;

Ao Prof. Luiz Henrique Dall'Antonia, por partilhar de seu laboratório;

À Profa. Nadia Krieger da UFPR e aos seus alunos, por cederem seu tempo e espaço na execução de parte deste trabalho;

Aos estagiários Arnaldo Fernandes da Silva Filho e Bruna Zucoloto da Costa, por toda a ajuda concedida. Agradeço especialmente a Bruna, pela amizade e por ter compartilhado comigo da expectativa de bons resultados a cada experimento realizado;

Ao mestrando da Unesp de Jaboticabal/SP José Perez da Graça, pela grandeza de coração, amizade e por todo o apoio na rotina laboratorial quando presente na UEL;

À mestrandia Virgínia Carla de Almeida Falcão, pela amizade e pela grande ajuda técnica com os géis da eletroforese;

À amiga Silvia Andrea Conson, pela grande ajuda na edição das fotos;

À Profa. Sueli Obara Doi, sempre muito atenciosa e expressivamente otimista com todos;

Ao colega de turma Alexandre Tadachi Morey, pelas aulas de Biologia Molecular;

Aos meus colegas de mestrado, aos estagiários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia e aos alunos de TCC do Curso de Química, pela agradável companhia no dia-a-dia da rotina laboratorial;

À Simone Ferreira Mendes, pela grande amizade e companhia durante o período das disciplinas;

À Eliane Kaori Fukuda, amiga desde os tempos da Graduação em Farmácia e Bioquímica, agradeço muitíssimo pelo incentivo;

Aos amigos Cassiano Correa da Silva e Fabiana Guillen Moreira Gasparin, por toda a ajuda;

Aos funcionários do departamento de Bioquímica e Biotecnologia: Nelson Rodriguez Janeiro, Sérgio do Nascimento Evangelista, Elda Jonas Aguiar,

Neusa Zamuner de Souza, Sandra Aparecida Defende, Silvia Borba da Costa e Rosemeire Santos Souza;

À Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade da realização deste trabalho e aos professores do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, pelos valiosos ensinamentos;

A todos que tenham contribuído de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Dedico este trabalho aos meus amados pais, José Carlos Messias e Ana Maria Peres Messias, para mim exemplos de ternura, superação, honestidade e simplicidade.

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o címbalo que tine” (1 Co. 13:1).

"Nós somos feitos do tecido de que são feitos os sonhos."

William Shakespeare

MESSIAS, Josana Maria. **Produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em diferentes fontes de carbono.** 2008, 204 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2008.

RESUMO

Fungos do gênero *Botryosphaeria* são endofíticos e além de secretarem exopolissacarídeo e lacase, ainda não tinham sido descritos como produtores de lipase (E.C.3.1.1.3). Esta última enzima possui amplas aplicações biotecnológicas, podendo ser utilizada na produção de biodiesel, detergentes, medicamentos, processamento de cosméticos e também na indústria alimentícia. Neste trabalho foram avaliados nove isolados fúngicos do gênero *Botryosphaeria*, quanto à produção de lipases e lacases em diferentes óleos vegetais (soja, oliva, girassol, milho, canola, babaçu, gergelim e algodão) e também em glicerol, como fontes únicas de carbono. O *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 foi o isolado que se destacou como produtor de lacase, enquanto que o *B. ribis* EC-01 foi o melhor produtor de lipase, em todos os óleos vegetais e glicerol. O pH ótimo de atividade da lipase deste isolado foi 8,0 e a temperatura ótima 55°C (2 minutos de reação); parâmetros que proporcionaram um aumento de 8 vezes na atividade enzimática. A solução de lipase do *B. ribis* EC-01 foi estável por 24 horas até 55 °C e também foi na faixa de pH de 1,0 a 10,0 (75 % de atividade residual) por uma hora à temperatura ambiente (30 ± 2 °C). A atividade da lipase foi aumentada na presença de 1,0 mM de K⁺, Zn²⁺, Na⁺, Ba²⁺ e Co²⁺, destacando-se Mn²⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺ e os íons Cu²⁺ (1,0 mM) e Hg²⁺ (10 mM) diminuíram a atividade enzimática. Detergentes como Tween 80, SDS e Triton X-100 também aumentaram a atividade desta lipase. A enzima permaneceu praticamente 100 % estável na presença de 50 % (v/v) de metanol, etanol e glicerol e apresentou 68 % de atividade residual quando incubada em isooctano (99,3 %, v/v) durante 1 hora à temperatura ambiente. A lipase de *B. ribis* EC-01 é uma enzima constitutiva, não é regulada por glucose e sua produção nos diferentes carboidratos testados foi maior em lactose. Quando a fonte de carbono foi o óleo de soja (1,0 %, v/v), as fontes de nitrogênio e fosfato importantes para o aumento da atividade de lipase foram NH₄NO₃ e KH₂PO₄. A curva de crescimento revelou que a produção da enzima (U/mL) foi maior no 4º dia de cultivo, todavia, a melhor atividade específica foi registrada no 3º dia. O pH inicial do meio de cultivo beneficiou a produção da enzima quando acertado para 8,5, cujas atividades enzimática e específica foram 145,5 U/mL e 632,2 U/mg (120 h de cultivo), respectivamente. Dentre os detergentes avaliados como fonte de carbono, o Tween 80 (1,0 %, m/v) proporcionou maior produção de lipase pelo *B. ribis* EC-01 e quando as fontes de carbono foram diferentes ácidos graxos, o ácido esteárico emulsificado com Triton X-100 (0,1 %, m/v) foi a melhor fonte para a produção de lipase, seguido do ácido palmítico. A trioleína promoveu boa produção da enzima por este ascomiceto, enquanto que os triacilgliceróis tributirina e tricaprilina inibiram o crescimento do fungo. A lipase foi produzida em diferentes concentrações de glicerol, entretanto, a maior produção da enzima foi em 4,0 % (m/v). Através de planejamento estatístico de misturas e sendo estas representadas pelas fontes de carbono glicerol (futuro rejeito do biodiesel) e óleo de soja, foram realizados, para todas as Condições, delineamentos fatoriais fracionários (2⁵⁻¹). Os fatores selecionados foram: tempo de cultivo, pH inicial do meio, concentração de NH₄NO₃

(%, m/v), concentração de KH_2PO_4 (%, m/v) e velocidade de rotação (rpm). O tempo de cultivo e o pH inicial do meio foram as variáveis que mais influenciaram a produção de lipase pelo *B. ribis* EC-01 e uma mistura de glicerol e óleo de soja adequada foi 3,6 % (m/v) e 0,8 % (v/v), respectivamente. Para esta última Condição, no planejamento fatorial completo (2^5), maior produção de lipase (413,6 U/mg) foi obtida em 72 horas de cultivo a 120 rpm, com 0,4 % (m/v) de NH_4NO_3 , 1,0 % (m/v) de KH_2PO_4 e pH inicial 4,5. Foi significativa a interação entre todos os fatores, sendo o pH inicial do meio de cultivo a variável que mais influenciou a produção da lipase. A lipase de *B. ribis* EC-01 produzida em qualquer condição de cultivo hidrolisou ésteres de *p*-nitrofenila e triacilgliceróis de cadeia curta, média e longa. Somente as lipases obtidas dos cultivos que continham óleo de soja como uma das fontes de carbono e o pH inicial do meio era 5,8-6,0 (pH do meio de Vogel) ou 8,5 hidrolisaram o MUF-butirato (zimograma). O óleo de soja é produzido em abundância no Brasil sendo um substrato barato para a produção de lipases, assim como o glicerol, que é um subproduto da indústria produtora de biodiesel. Portanto, o uso destas fontes de carbono pode ser uma estratégia biotecnológica viável para a obtenção de lipase por *B. ribis* EC-01.

Palavras-chave: Lipase. Lacase. *Botryosphaeria*. Estabilidade. Planejamento fatorial.

MESSIAS, Josana Maria. **Production of lipases by *Botryosphaeria ribis* EC-01 in different carbon sources.** 2008, 204 f. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina. 2008.

ABSTRACT

Fungi of the *Botryosphaeria* genus are endophytic and secrete exopolysaccharide and laccase, but have not been reported as lipase (E.C.3.1.1.3) producers. The latter enzyme has several biotechnological applications, and can be used in production of biodiesel, detergents, medicines, processing of cosmetics and in food industry as well. In this work, nine isolates of *Botryosphaeria* were evaluated for lipase and laccase production on different vegetable oils (soybean, olive, sunflower, maize, canola, babassu, sesame and cotton) and glycerol as sole carbon source. *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 was the best laccase producer, whereas *B. ribis* EC-01 produced lipase with the highest yields, in all vegetable oils and glycerol. Optimal pH for activity of the lipase produced by the latter was 8.0 and optimal temperature was 55 °C (2-minute reaction time), and such parameters led to a 8-fold increase in enzyme activity. *B. ribis* EC-01 lipase solution was stable for 24 hours at up to 55 °C and was likewise stable in pH ranging from 1.0 to 10.0 (75 % residual activity) for one hour at room temperature (30 ± 2 °C). Lipase activity was increased in the presence of 1.0 mM K⁺, Zn²⁺, Na⁺, Ba²⁺ and Co²⁺, and was further increased in the presence of Mn²⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺; on the other hand, Cu²⁺ (1.0 mM) and Hg²⁺ (10 mM) decreased enzyme activity. Detergents such as Tween 80, sodium dodecyl sulphate (SDS) and Triton X-100 also increased the activity of this lipase. This enzyme remained practically 100 % stable in the presence of 50 % (v/v) methanol, ethanol and glycerol, and had 68 % residual activity when incubated in isooctane (99.3 %, v/v) for 1 hour at room temperature (30°C ± 2 °C). The lipase from *B. ribis* EC-01 is a constitutive enzyme, it is not modulated by glucose, and it was produced in all carbohydrate carbon sources with highest yields on lactose. When soybean oil (1.0 %, v/v) was the carbon source, the important nitrogen and phosphate sources for increasing lipase production were NH₄NO₃ and KH₂PO₄. A growth profile showed the highest enzyme production (U/mL) in the fourth day of growth, however the best specific activity was observed in the third day. Initial pH of culture medium favoured enzyme production when adjusted to 8.5, leading to 145.5 U/mL and 632.2 U/mg (120 h growth time) of enzyme and specific activities, respectively. Amongst the detergents evaluated as carbon sources, Tween 80 (1.0 %, m/v) led to the highest production of lipase by *B. ribis* EC-01 and when different fatty acids were tested, stearic acid emulsified with Triton X-100 (0.1 %, m/v) was the best source for production of lipase, followed by palmitic acid. Triolein provided major production of enzyme by the same isolate, whereas triacylglycerols tributyrin and tricaprilyn inhibited fungal growth. Lipase was produced on all glycerol concentrations with the highest yields on 4.0 % (m/v). Statistical planning of mixtures containing the carbon sources glycerol (biodiesel byproduct) and soybean oil were carried out for all conditions, using fractional factorial designs (2⁵⁻¹). Selected factors were: growth time, initial medium pH, NH₄NO₃ (w/v), KH₂PO₄ (w/v) and rotation speed (rpm). Growth time and initial medium pH were the most influential variables in production of lipase by *B. ribis* EC-01 and the adequate mixture of glycerol and soybean oil contained 3,6 % (w/v) and 0.8 % (v/v) respectively. For the latter condition, in the full

factorial design (2⁵) the highest yield of lipase (413.6 U/mg) was observed in 72 hours of growth at 120 rpm, with 0.4 % (w/v) NH₄NO₃, 1.0 % (w/v) KH₂PO₄ and initial pH 4.5. Interactions amongst all factors were significant, and initial pH of culture medium was the variable that most markedly influenced production of lipase. The *B. ribis* EC-01 lipase was produced in any culture conditions and hydrolysed *p*-nitrophenyl esters and triacylglycerols of short-, medium- and long-chain. Only the lipases obtained from cultures containing soybean oil as one of the carbon sources, and initial pH of either 5.8-6.0 (Vogel's medium pH) or 8.5 hydrolysed MUF-butyrate (zymogram). Soybean oil is abundantly produced in Brazil, and along with glycerol, a byproduct from production of biodiesel, can be used as a low-cost substrate for production of lipases. Therefore, the use of these carbon sources can be a feasible biotechnological strategy for obtaining lipase *B. ribis* EC-01.

Keywords: Lipase. Laccase. *Botryosphaeria*. Stability. Factorial design.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Algumas lipases microbianas comercialmente disponíveis.....	37
Tabela 3.2 – Microrganismos produtores de lipases relatados na literatura científica (1965 até início de 2009)	38
Tabela 3.3 – Comparação entre fermentação sólida e submersa.....	41
Tabela 3.4 – Comparação de meios e parâmetros de cultivo para a produção de lipases por alguns fungos filamentosos.....	43
Tabela 3.5 – Características cinéticas e físico-químicas de lipases fúngicas	49
Tabela 4.1 – Meio BDA.....	65
Tabela 4.2 – Meio de Vogel.	65
Tabela 4.3 – Meio VGA.....	65
Tabela 4.4 – Composição do meio de cultivo sólido para selecionar microrganismos produtores de lipases.....	68
Tabela 4.5 – Fontes de carbono adicionadas no meio de cultivo	75
Tabela 4.6 – Misturas das fontes de carbono	79
Tabela 4.7 – Delineamento fatorial fracionário (25-1) realizado para cada uma das misturas (A, B, C, D, E) das fontes de carbono utilizadas	80
Tabela 4.8 – Fatores utilizados em cada planejamento fatorial fracionário (25-1) e seus valores reais.....	80
Tabela 4.9 – Planejamento Fatorial (25) Composto Central para a nova mistura (Condição F) das fontes de carbono glicerol e óleo de soja	82
Tabela 5.1 – Produção de lacase (U/mg) pelos isolados de <i>Botryosphaeria</i> em diferentes óleos vegetais ou glicerol como única fonte de carbono.....	90
Tabela 5.2 – Valores médios de Biomassa (g/L) para os nove ascomicetos testados quanto a produção de lacases nos diferentes óleos vegetais (1,0 %, v/v) ou glicerol (1,0 %, v/v).....	91
Tabela 5.3 – Perfil do pH final dos cultivos em óleos vegetais ou glicerol como fontes de carbono.....	92

Artigo A

Table 1 – Specific lipase activities of nine isolates of <i>Botryosphaeria</i> spp. cultivated on vegetable oils and glycerol	113
Table 2 – Production of lipase by <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 grown on different carbon sources	114
Table 3 – Influence of metal cations, EDTA and surfactants on the activity of a crude lipase from <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01	115
Table 4 – Influence of different solvents on the activity of a crude lipase from <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01	116

Artigo B

Tabela 1 – Misturas das fontes de carbono glicerol (% m/v) e óleo de soja (% v/v) para a produção de lipase por <i>B. ribis</i> EC-01 utilizadas em cada planejamento fatorial fracionário (2^{5-1})	134
Tabela 2 – Resposta da atividade específica (U/mg) de lipase produzida por <i>B. ribis</i> EC-01 para cada planejamento fatorial fracionário (2^{5-1}) das condições de misturas das fontes de carbono glicerol e óleo de soja (A, B, C, D e E)	134
Tabela 3 – Respostas para o planejamento fatorial (2^5) composto central de <i>B. ribis</i> EC-01 para a condição de mistura F (glicerol (3,6%; m/v) e óleo de soja (0,8%; v/v))	135
Tabela 4 – Comparação das atividades das lipases (%) de <i>B. ribis</i> EC-01, para diferentes substratos, obtidas em diferentes condições de cultivo	136

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	–	Produção de cerveja por catálise enzimática no Antigo Egito.....	25
Figura 3.2	–	Ação catalítica de lipases.....	27
Figura 3.3	–	Reações catalisadas por lipases.....	28
Figura 3.4	–	Prováveis funções das lipases extracelulares microbianas	30
Figura 3.5	–	Modelo estrutural de α/β hidrolases.....	31
Figura 3.6	–	Modelo catalítico proposto para as lipases	32
Figura 3.7	–	Modelo de ação de lipase em substratos solúveis e insolúveis em água	33
Figura 3.8 A	–	Conformação fechada da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	34
Figura 3.8 B	–	Conformação aberta da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	34
Figura 3.8 C	–	Comparação da posição da tampa	35
Figura 3.9	–	Estrutura em 3D da lipase pancreática humana	35
Figura 3.10	–	Teste qualitativo para a produção de lipases em placas de Petri contendo agar-tributirina	42
Figura 3.11	–	Teste qualitativo para a produção de lipases em placas de Petri contendo o corante Rodamina B	45
Figura 3.12	–	Produção de biodiesel por transesterificação	55
Figura 3.13	–	Produção de biodiesel por processo alcalino.....	56
Figura 3.14	–	Produção enzimática do biodiesel	57
Figura 4.1	–	Isolados de <i>Botryosphaeria</i> crescidos em VGA após 5 dias de cultivo a 28 °C.....	67
Figura 4.2	–	Esquema geral para a obtenção do sobrenadante de cultivo utilizado nas determinações de atividade de lipase e lacase.....	71
Figura 4.3	–	Reação de hidrólise do pNPP pela lipase	84
Figura 5.1	–	Perfil da produção de lacase (U/mL) por <i>B. rhodina</i> MAMB-05 e <i>L. theobromae</i> MMLR (isolado de laranja) em diferentes óleos vegetais (1,0 %, v/v) ou glicerol (1,0 %, m/v)	88

Artigo A

- Figure 1** – Stability of the crude lipase from *Botryosphaeria ribis* EC-01 at different temperatures ranging from 30 ° to 85 °C (3 h), and 30 ° to 55 °C (24 h) 117

Artigo B

- Figura 1** – **(a)** Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de lipases por *B. ribis* EC-01. As concentrações (m/v) utilizadas foram: 0,2% de uréia, milhocina[®], extrato de levedura, peptona, NH₄NO₃ ou (NH₄)₂SO₄ e 0,4% de NaNO₃ ou NH₄Cl. Para todos os cultivos, a fonte de fosfato foi o KH₂PO₄ (0,5%, m/v). **(b)** Efeito de diferentes fontes de fosfato (0,5%, m/v) na produção de lipases por *B. ribis* EC-01. Para todos os cultivos, a fonte de nitrogênio foi o NH₄NO₃ (0,2%, m/v). **(a, b)** A fonte de carbono utilizada foi o óleo de soja (1,0%, v/v) e os cultivos tiveram duração de 5 dias, a 180 rpm e 28 ± 2 °C 137
- Figura 2** – **(a)** Atividade específica da lipase (U/mg) de *B. ribis* EC-01 em relação ao tempo de cultivo (horas), sendo KH₂PO₄ ou K₂HPO₄ (0,5%, m/v) as fontes de fosfato do processo fermentativo submerso. **(b)** Perfil da produção de lipase (U/mg e U/mL) de *B. ribis* EC-01 em cultivos com KH₂PO₄ (0,5%, m/v) em relação a produção de biomassa fúngica (g/L) e pH final do meio. O pH inicial do meio de cultivo (sem ajuste) foi 5,78. **(c)** Perfil da produção de lipase (U/mg e U/mL) de *B. ribis* EC-01 em cultivos com K₂HPO₄ (0,5%, m/v) em relação a produção de biomassa fúngica (g/L) e pH final do meio. O pH inicial do meio de cultivo (sem ajuste) foi 7,20. **(d)** Efeito do pH inicial do meio (cultivo de 120 h) na produção de lipase por *B. ribis* EC-01, sendo a fonte de fosfato do meio o KH₂PO₄ ou K₂HPO₄ (0,5%, m/v). Em todos os experimentos **(a, b, c ou d)** a fonte de carbono utilizada foi o óleo de soja 1,0% (v/v) e a fonte de nitrogênio foi o NH₄NO₃ (0,2%, m/v) 138

Figura 3 – Gráficos de contorno para o planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} realizado para as Condições de misturas “A” e “E” para a produção de lipase (U/mg) por <i>B. ribis</i> EC-01. Perfil da interação “Tempo de cultivo x pH inicial do meio.”	139
Figura 4 – Estimativa dos efeitos e gráfico normal das estimativas para as Condições de misturas “B, C e D”. O pH inicial do meio e o tempo de cultivo foram as variáveis que mais influenciaram na produção de lipase (U/mg) por <i>B. ribis</i> EC-01. (X_1) pH inicial do meio; (X_2) tempo de cultivo (h); (X_3) concentração de NH_4NO_3 (% m/v), (X_4) concentração de KH_2PO_4 (% m/v) e ($X_5 = X_1X_2X_3X_4$) velocidade de rotação (rpm).....	140
Figura 5 – Diagrama entre as respostas previstas da produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 e as respostas originais para o modelo estatístico de planejamento de misturas.....	141
Figura 6 – Razão C/N , C/P e N/P para a melhor atividade de lipase (U/mg) obtida em cada uma das Condições de misturas (Condição A= nº 15 (c.A), B= nº 07 (c.B), C= nº 03 (c.C), D= nº 07 (c.D), E= nº 07 (c.E) e F= nº 13 (c.F) (vide Tabelas 2 e 3)). C = Carbono, N = Nitrogênio e P = Fósforo	141

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

µG	MICROGRAMA
ABTS	ÁCIDO 2,2 AZINO - BIS(3 - ETILBENZOTIAZOLINA - 6 - SULFÔNICO)
ANOVA	ANÁLISE DE VARIÂNCIA
B. RHODINA	BOTRYOSPHAERIA RHODINA
B. RIBIS	BOTRYOSPHAERIA RIBIS
BDA	AGAR-BATATA DEXTROSADO
CM	CENTÍMETRO
C/N	RAZÃO/RELAÇÃO CARBONO/NITROGÊNIO
C/P	RAZÃO/RELAÇÃO CARBONO/FOSFATO
°C	GRAUS CELSIUS
EC	COMITÊ ENZIMÁTICO
FES	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO
G	GRAMA
KDA	QUILODÁLTON
KG	QUILOGRAMA
L	LITRO
L. THEOB.	LASIODIPLODIA THEOBROMAE
M	MASSA
M	MOLAR
MG	MILIGRAMA
ML	MILILITRO
MM	MILIMOLAR
MSR	METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA
N/P	RAZÃO/RELAÇÃO NITROGÊNIO/FOSFATO
P-NPP	PALMITATO DE P-NITROFENILA
Q.S.P.	QUANTIDADE SUFICIENTE PARA
RPM	ROTAÇÕES POR MINUTO
SL	LIPASE PRESENTE NO SOBRENADANTE
U	UNIDADE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA
V	VOLUME
VGA	VOGEL-GLUCOSE-ÁGAR

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GERAL	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: PRODUÇÃO DE LIPASES POR MICROORGANISMOS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	25
3.1	LIPASES.....	25
3.1.1	As Enzimas e a Biocatálise	25
3.1.2	Definição e Classificação das Lipases.....	26
3.1.3	Fontes de Obtenção de Lípases.....	29
3.1.4	Aspectos Estruturais das Lípases.....	30
3.1.5	Mecanismo de Lipólise e o Fenômeno da Ativação Interfacial	31
3.2	MICROORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES	37
3.2.1	Produção de Lipases por Fungos Filamentosos.....	40
3.3	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LIPASES.....	42
3.3.1	Métodos Qualitativos para Selecionar Microrganismos Produtores de Lipase Extracelular	42
3.3.2	Métodos Quantitativos para Determinar a Atividade de Lípases	46
3.4	CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DAS LIPASES MICROBIANAS	46
3.4.1	Lipases Bacterianas	46
3.4.2	Lipases Fúngicas.....	48
3.5	MELHORAMENTO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS COM O AUXÍLIO DO PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO DE MISTURAS, DO DELINEAMENTO FATORIAL E DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	48
3.6	APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS LIPASES	53
3.6.1	As Lipases e o Biodiesel.....	54
3.7	LIPASES MICROBIANAS COMO FATORES DE VIRULÊNCIA O GÊNERO BOTRYOSPHAERIA	58
3.8	O GÊNERO <i>BOTRYOSPHAERIA</i>	60

4 MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1 REAGENTES.....	63
4.2 EQUIPAMENTOS	64
4.3 SELEÇÃO DE ISOLADOS DE BOTRYOSPHERIA PRODUTORES DE LIPASES E LACASES	65
4.3.1 Meios de Cultivo	65
4.3.2 Microrganismos	66
4.3.2.1 Manutenção dos microrganismos.....	66
4.3.2.2 Preparo do inóculo	66
4.3.3 Seleção de Isolados de Botryosphaeria Produtores de Lípases	67
4.3.3.1 Seleção dos isolados produtores de lipase em meio sólido com Rodamina B.....	68
4.3.3.2 Seleção dos isolados produtores de lipase por método quantitativo em meio líquido, sob fermentação submersa	68
4.3.3.2.1 <i>Estudo da aeração do meio de cultivo</i>	69
4.3.4 Seleção de Isolados de Botryosphaeria Produtores de Lacase em Óleos Vegetais ou Glicerol, através de Fermentação Submersa	70
4.3.5 Interrupção dos Cultivos	70
4.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS E FÍSICO-QUÍMICOS DA LIPASE DE BOTRYOSPHERIA RIBIS EC-01.....	71
4.4.1 Determinação do pH e Temperatura Ótimos da Lipase de Botryosphaeria ribis EC-01.....	71
4.4.2 Perfil da Atividade de Lipases de Botryosphaeria ribis EC-01 Obtidas em Diferentes Condições de Cultivo.....	72
4.4.3 Ensaio de Estabilidade da Atividade da Lipase de Botryosphaeria ribis EC-01	72
4.4.3.1 Estabilidade da lipase de Botryosphaeria ribis EC-01 em diferentes temperaturas e valores de Ph.....	72
4.4.3.2 Efeito de íons e detergentes na atividade da lipase de Botryosphaeria ribis EC-01.....	73
4.4.3.3 Efeito de solventes orgânicos na atividade da lipase de Botryosphaeria ribis EC-01.....	73
4.4.4 Avaliação do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida revelada para proteína e atividade enzimática (zimograma).....	73

4.5	EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO, NITROGÊNIO, FOSFATO E FEITO DO PH INICIAL NA PRODUÇÃO DE LIPASES POR BOTRYOSPHAERIA RIBIS EC-01	74
4.5.1	Efeito da Fonte de Carbono na Produção de Lípase.....	75
4.5.2	Efeito da fonte de nitrogênio na produção de lípase	76
4.5.2.1	Preparo da milhocina® para sua utilização no meio de cultivo	76
4.5.3	Efeito da Fonte de Fosfato na Produção de Lipase por Botryosphaeria Ribis EC-01	76
4.5.3.1	Efeito do pH inicial de cultivo na produção de lipase por Botryosphaeria ribis EC-01.....	77
4.6	MELHORAMENTO DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR BOTRYOSPHAERIA RIBIS EC-01 COM UTILIZAÇÃO DAS FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS: PLANEJAMENTO DE MISTURAS E DELINEAMENTO FATORIAL	77
4.7	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	83
4.7.1	Determinações Analíticas	83
4.7.2	Determinações Enzimáticas	84
4.7.2.1	Determinação da atividade de lípase	84
4.7.2.2	Determinação da atividade de lacase.....	86
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
5.1	SELEÇÃO DOS ISOLADOS DE BOTRYOSPHAERIA PRODUTORES DE LACASES ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	87
5.2	SELEÇÃO DOS ISOLADOS DE BOTRYOSPHAERIA PRODUTORES DE LIPASES	93
5.2.1	Artigo A: “Seleção de Linhagens de Botryosphaeria Produtoras de Lipases: Produção de Lipase por Botryosphaeria ribis EC-01 em Óleo de Soja e outras Fontes de Carbono”	94
5.2.2	Artigo B: “Melhoramento da Produção de Lipase por Botryosphaeria ribis EC-01 em Óleo de Soja e Glicerol como Fontes de Carbono Utilizando-se Planejamento Estatístico de Misturas”	118
	CONCLUSÕES	148
	REFERÊNCIAS	150

APÊNDICES	166
APÊNDICE A – Visualização da produção de lipase por ascomicetos do gênero <i>Botryosphaeria</i> em cultivo sólido, contendo óleo de soja (1,0%, v/v) e Rodamina B (0,001%, m/v). Avaliação dos melhores fungos produtores.....	167
APÊNDICE B – Determinação do pH ótimo para a atividade de lipase (U/mL) produzida por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01	169
APÊNDICE C – Determinação da temperatura (°C) ótima para a atividade de lipase (U/mL) produzida por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01. O tempo de incubação da reação foi de 2 minutos.....	170
APÊNDICE D – Perfil de atividade da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 (obtida de diversos cultivos) frente à diferentes ésteres de p-nitrofenila	171
APÊNDICE E – Perfil de atividade da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 (obtida de diversos cultivos) frente à diferentes triacilgliceróis ou óleo de soja comercial.....	172
APÊNDICE F – Estabilidade da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em diferentes valores de pH durante 1 hora de incubação à temperatura ambiente (30 °C).....	173
APÊNDICE G – Padrão eletroforético e zimograma da lipase de <i>B. ribis</i> EC-01 (obtida de diferentes condições de cultivo).....	174
APÊNDICE H – Influência do pH inicial 8,5 na produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em cultivos contendo como fonte de carbono o óleo de soja emulsificado ou não por Tween ou Triton X-100 (0,1%, m/v)	175
APÊNDICE I – Respostas observadas para as Condições de misturas (A, B, C, D e E) das fontes de carbono glicerol e óleo de soja em cada planejamento fatorial fracionário 25-1	176
APÊNDICE J – Observação dos efeitos das variáveis através de gráficos de Pareto para a produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01: planejamento fatorial fracionário (25-1) para cada Condição de mistura (A, B, C, D e E) das fontes de carbono glicerol e óleo de soja	179

APÊNDICE K – Planejamento fatorial 2 ⁵ para a Condição de mistura F (glicerol (3,56%, m/v) e óleo de soja (0,8%, v/v)). Respostas observadas através de 4 gráficos cúbicos	181
ANEXOS	182
ANEXO A – Dosagem de carbono, nitrogênio e fósforo total do óleo de soja Liza (Lote 090035RV – Cargil Agrícola S/A) utilizado neste trabalho	183
ANEXO B – Resumo enviado ao BioMicroWorld 2007 – Sevilha/Espanha	184
ANEXO C – Resumo enviado ao ENZITEC 2008 – Rio de Janeiro/Brasil	186
ANEXO D – Resumo enviado ao VI Congresso Latino Americano de Micologia 2008 – Mar Del Plata/Argentina	189
ANEXO E – Guia para autores do periódico Enzyme and Microbial Technology.....	190
ANEXO F – Guia para autores do periódico Process Biochemistry.....	198

1 INTRODUÇÃO

Alguns membros da família *Botryosphaeriaceae* são os mais agressivos patógenos da comunidade fúngica endofítica e muitas vezes acabam por matar grande parte de seu hospedeiro. Esta habilidade de colonização está associada à produção de enzimas extracelulares (como celulases, pectinases, lacases e lipases) e à produção de exopolissacarídeos (que obstruem os vasos lenhosos).

As lacases (polifenol oxidases) e as lipases (glicerol éster hidrolases), além de auxiliarem na ação patogênica de alguns microrganismos, são também utilizadas em processos biotecnológicos. As lacases participam da remoção de compostos fenólicos de sucos de frutas e em processos de biorremediação (corantes; xenobióticos), por exemplo.

As lipases além de catalisarem reações de hidrólise também realizam reações reversas, como esterificação, transesterificação, aminólise e lactonização. Devido as suas propriedades peculiares, atuam em uma variedade de segmentos: indústria de alimentos, de detergentes, farmacêutica, agroquímica (inseticidas e pesticidas) e oleoquímica (modificação de óleos e gorduras; síntese de biodiesel).

Os óleos vegetais, como o de soja, constituem fontes de carbono baratas para a produção de enzimas. *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, isolado de cranco de eucalipto, produziu cinco vezes mais lacase no cultivo que continha meio mínimo de Vogel acrescido de óleo de soja, em comparação ao cultivo que não o continha. Este fato gerou um questionamento: fungos deste gênero seriam lipolíticos? Através de Metodologia de Superfície de Resposta, também se constatou que o óleo de soja e Tween 80 adicionados no meio de cultivo melhoraram a produção de exopolissacarídeo pelo *B. rhodina* MAMB-05.

Até o presente, nenhum artigo da literatura nacional e internacional descreveu a produção de lipases pelo gênero *Botryosphaeria*. Pesquisas sobre a produção, propriedades e aplicações das lipases deste gênero fúngico, certamente irão contribuir não somente para o seu controle, como também no desenvolvimento de novos processos biotecnológicos.

Outra fonte de carbono para a produção de lipase pode ser representada pelo glicerol. Buscando reduzir os futuros problemas ambientais por acúmulo deste álcool (subproduto da produção do biodiesel), estratégias biotecnológicas para obtenção de produtos com maior valor agregado devem ser consideradas.

A avaliação de diferentes óleos vegetais como fonte única de carbono do cultivo, assim como o glicerol, constitui parte dos objetivos desta dissertação de mestrado, além da seleção de nove isolados do gênero *Botryosphaeria* como produtores de lipases, conforme os objetivos descritos a seguir.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo selecionar isolados de *Botryosphaeria* produtores de lipases, como também avaliar a influência dos componentes e das condições de cultivo na produção destas enzimas lipolíticas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Selecionar dentre 9 isolados de *Botryosphaeria* os produtores de lipases através de testes qualitativos em placas de Petri e quantitativamente, por processo fermentativo submerso, na presença de diferentes óleos vegetais ou glicerol.

2.2.2 Selecionar dentre 9 isolados de *Botryosphaeria* os produtores de lacases, por processo fermentativo submerso, na presença de diferentes óleos vegetais ou glicerol.

2.2.3 Estudar as propriedades cinéticas da atividade lipolítica presente no sobrenadante de cultura do microrganismo selecionado e verificar a influência de diferentes solventes orgânicos, detergentes e íons metálicos na estabilidade da enzima.

2.2.4 Determinar a influência de parâmetros bioquímico-fisiológicos na produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01, tais como diferentes fontes de carbono, nitrogênio e fosfato, pH inicial do meio e tempo de cultivo.

2.2.5 Melhorar a produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 através de planejamento estatístico de misturas e de delineamento fatorial.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

PRODUÇÃO DE LIPASES POR MICRORGANISMOS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

3.1 LIPASES

3.1.1 As Enzimas e a Biocatálise

A história das enzimas e suas aplicações em processos biocatalíticos datam desde mil anos atrás no Antigo Egito (Figura 3.1). A comprovação deste fato baseia-se num velho papiro que exhibe métodos usados na preservação de comida e bebidas alcóolicas (GHANEM, 2007).



Figura 3.1 – Produção da cerveja por catálise enzimática no Antigo Egito
Fonte: Ghanem (2007)

Os processos biotecnológicos que utilizam catalisadores biológicos em seqüências de conversão química são conhecidos como biocatalíticos. Tais catalisadores podem ser células microbianas íntegras, enzimas, RNAs catalíticos (ribozimas) e também anticorpos (WALSH, 2001). Em muitos processos puramente químicos, os biocatalisadores podem ser notáveis substitutos (WARNER, 2004) e

destacam-se pela elevada velocidade de reação, condições brandas, compatibilidade com substratos sintéticos; em alguns casos, podem catalisar as reações nos dois sentidos e ainda podem apresentar seletividade quanto ao tipo de reação que catalisam (PAQUES; MACEDO, 2006).

O uso de enzimas nas indústrias possibilita o desenvolvimento de processos tecnológicos tão eficientes quanto aos realizados pela natureza (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Atualmente cerca de 4000 enzimas são conhecidas mundialmente, e destas, aproximadamente 200 são utilizadas comercialmente, sendo a grande maioria de origem microbiana (SHARMA et al., 2001).

Pelo menos 75% de todas as enzimas industrializadas são hidrolases e 90% destas são produzidas por microrganismos através de processo fermentativo. Depois das proteases e carboidrases, as lipases constituem o terceiro maior grupo em vendas, segundo uma estimativa mundial relatada por Jaeger e colaboradores (1997).

3.1.2 Definição e Classificação das Lipases

A NC – IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) classifica e codifica as enzimas de acordo com a reação catalisada. A abreviação E.C. (Enzyme Commission) seguida de até quatro dígitos identifica a classe e subclasse pertinentes à enzima (apud LIMA, 2000).

Genericamente, lipase é o nome de um grupo de enzimas participante da classe das hidrolases (E.C.3.1) com atuação sobre ligações éster (E.C.3.1.1). As lipases são definidas como glicerol éster hidrolases (E.C.3.1.1.3) que catalisam a hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa, liberando diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol (Figura 3.2) (JAEGER e REETZ, 1998; STEHR et al., 2003; GHANEM, 2007) na interface óleo-água (KAMINI; MALA; PUVANAKRISHNAN, 1998; KAMINI et al., 2000).

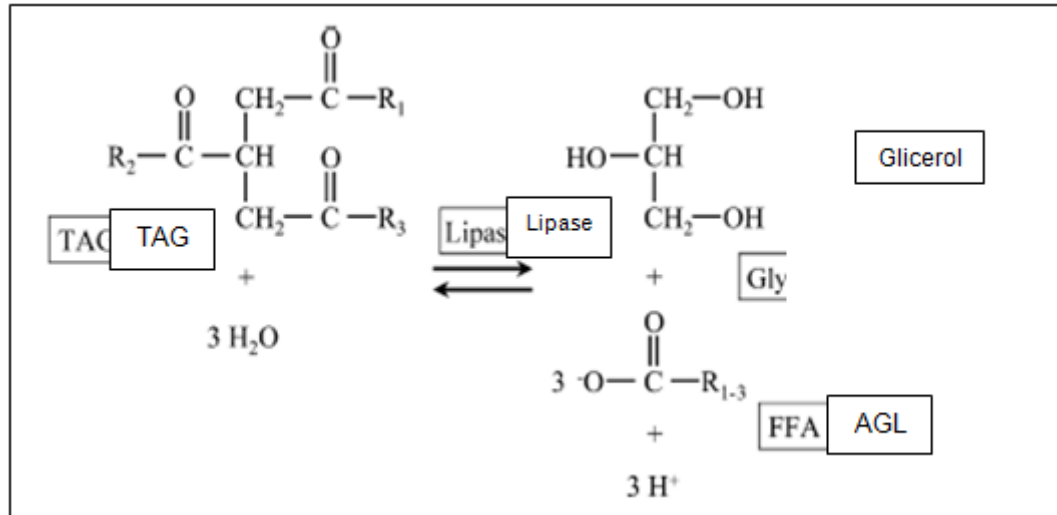


Figura 3.2 – Ação catalítica de lipases. Um triglicerídeo (TAG) pode ser hidrolisado para formar glicerol e ácidos graxos livres (AGL) ou a reação reversa (síntese) pode combinar glicerol e ácidos graxos para formar o triglicerídeo

Fonte: Stehr et al.(2003)

Não existe uma classificação que defina o número de carbonos de uma cadeia longa, porém, alguns autores consideram que triacilgliceróis de cadeia longa são aqueles representados por ácidos graxos com mais de 10 ou 12 átomos de carbono (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; JAEGER e EGGERT, 2002).

As lipases são também capazes de catalisar reações reversas, como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóólise e acidólise), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (esterificação intramolecular) (Figura 3.3), sendo que a atividade de água (a_w) do meio reacional é um dos fatores determinantes para cada classe de reação (MAHADIK et al., 2002; JAEGER e EGGERT, 2002; SAXENA et al., 2003; PAQUES e MACEDO, 2006; GHANEM, 2007).

A produção de lactonas sintéticas, por exemplo, por algumas lipases, constitui uma de suas importantes aplicações farmacêuticas, considerando-se as nobres propriedades das lactonas naturais, como as isoladas de *Streptomyces* e conhecidas como octalactinas, que apresentam atividade citotóxica significativa contra células de melanoma e de tumor de cólon. Outras lactonas como os nonanolídeos, representados pelas decastrictinas (isoladas do gênero *Penicillium*), apresentaram efeito inibitório na síntese do colesterol (LONGO; BOMBONATO; FERRAZ, 2007).

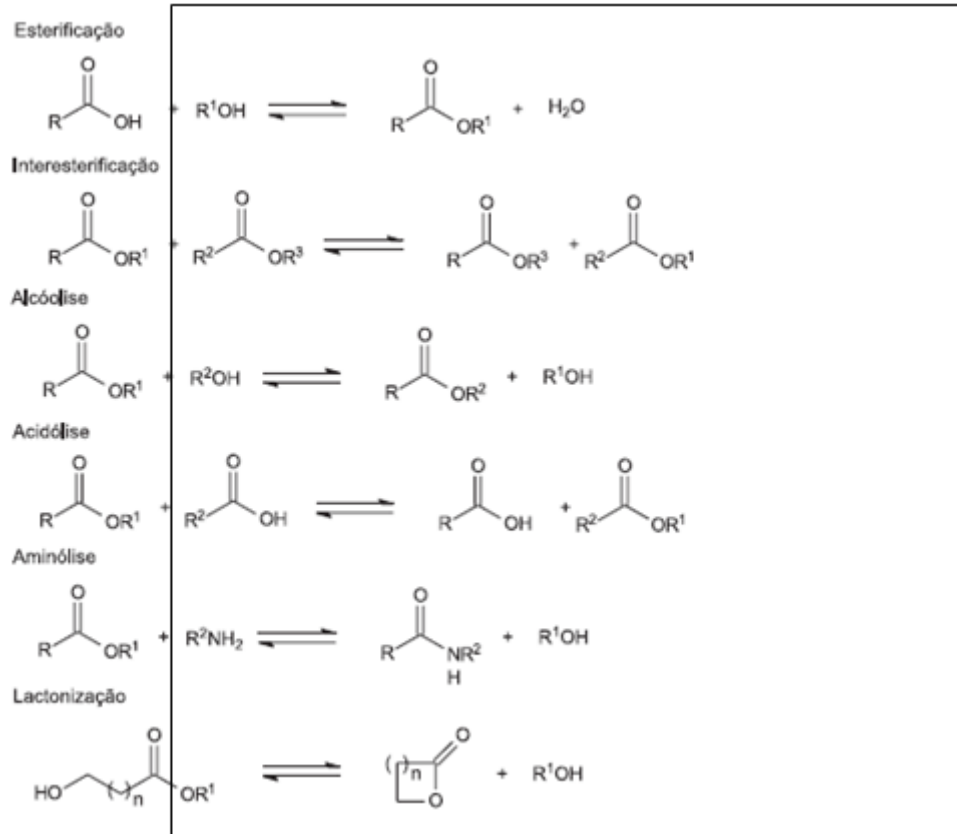


Figura 3.3 – Reações catalisadas por lipases
Fonte: Paques e Macedo (2006)

A síntese ou hidrólise de triacilgliceróis com menos de 12 carbonos em seus ácidos graxos, frequentemente é catalisada por esterases (E.C. 3.1.1.1). Estas são carboxil éster hidrolases e catalisam a hidrólise de ésteres, sendo, portanto, amplamente distribuídas na natureza. As esterases muitas vezes não se diferenciam das lipases, todavia, sua atividade enzimática praticamente se restringe à hidrólise de ligações éster em substratos solúveis em água (SARDA; DESNUELLE, 1958 apud DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; ALVAREZ-MACARIE; AUGIER-MAGRO; BARATTI, 1999). O substrato padrão para esterase é a tributirina enquanto que para lipase é a trioleína, entretanto, esta última também pode hidrolisar a tributirina (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; JAEGER e EGGERT, 2002)

3.1.3 Fontes de Obtenção de Lipases

Em 1856, Claude Bernard foi o primeiro a pesquisar a lipase de suco pancreático e verificou que esta enzima solubilizava gotas de óleo. Anos mais tarde houve interesse pelas lipases microbianas devido às dificuldades de obtenção desta enzima de origem animal (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

As enzimas lipolíticas são produzidas por organismos eucariontes superiores (plantas e animais) e inferiores (microrganismos), tanto eucariontes (leveduras e fungos) como procariontes (bactérias, incluindo-se os actinomicetos), variando suas propriedades de acordo com a procedência (SHARMA et al., 2001; SAXENA et al., 2003).

A produção de lipases microbianas é mais conveniente, pois estas são mais estáveis do que as extraídas de plantas e animais (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Também têm sido utilizadas, preferencialmente, devido à boa parte ser reconhecida como GRAS (Generally Regarded as Safe), ou seja, não são nocivas à saúde humana (JAEGER et al., 1994). As lipases fúngicas são valorizadas porque a maioria é extracelular e desta forma, são recuperadas do caldo fermentado com facilidade, seja por filtração ou centrifugação (TREVISAN, 2004).

A função mais proeminente de uma lipase extracelular para um microrganismo é a digestão de lipídeos para aquisição de nutrientes. A Figura 3.4 ilustra todas as supostas funções que uma lipase apresenta para a sobrevivência microbiana. A reação lipolítica pode abastecer o microrganismo com fontes de carbono para o seu crescimento; os ácidos graxos livres liberados auxiliam na adesão tecidual célula-célula e célula-hospedeiro. A lipase pode proporcionar condições sinérgicas para outras enzimas e através de hidrólise inespecífica, também pode apresentar atividade fosfolipolítica. Tanto as lipases quanto os seus produtos finais de hidrólise podem apresentar diferentes efeitos imunológicos, participando, por exemplo, de processos inflamatórios. Os microrganismos que secretam lipases apresentam vantagens na competição com a microflora, sendo estas enzimas um mecanismo de defesa (STEHR et al., 2003).

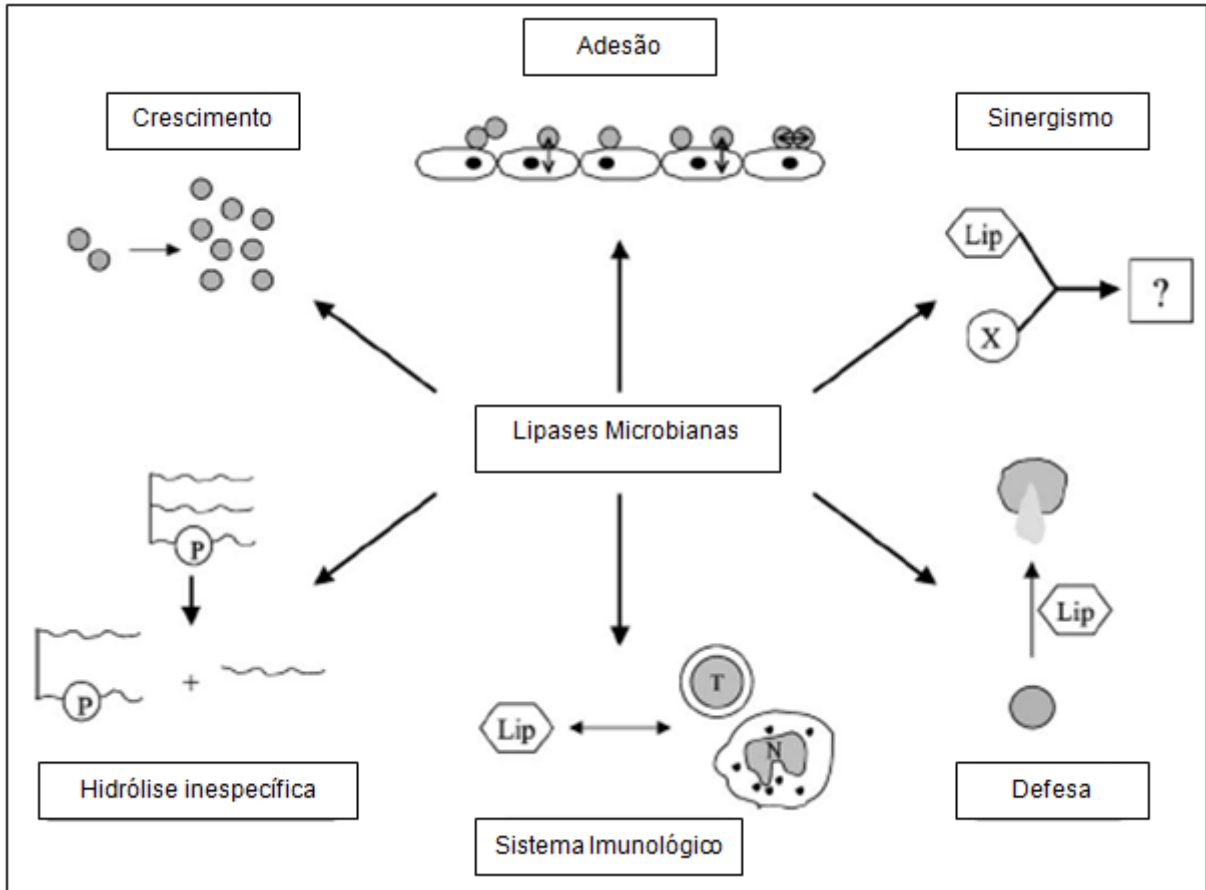


Figura 3.4 – Prováveis funções das lipases extracelulares microbianas
Fonte: Stehr et al.(2003)

3.1.4 Aspectos Estruturais das Lipases

A estrutura tridimensional (3D) da lipase fúngica de *Rhizomucor miehei* e da lipase pancreática humana foi determinada no final da década de 80. Desde então, a estrutura cristalina de muitas outras lipases já foi elucidada, facilitando consideravelmente estratégias de engenharia de proteínas (JAEGER; REETZ, 1998).

As lipases microbianas exibem uma característica padrão de dobra, conhecida como o entrelaçado de α/β -hidrolase (CYGLER et al., 1993; GORDILLO et al., 1995; JAEGER; REETZ, 1998; SAXENA et al., 2003; TREVISAN, 2004; PETERSEN; DANIEL, 2006; DIAZ et al., 2006) e o centro destas enzimas é composto por uma folha central β representada por até oito diferentes fitas ($\beta_1 - \beta_8$), conectadas por até seis α -hélices (A-F) (Figura 3.5) (HOLMQUIST, 2000). O sítio

ativo das lipases é formado por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos: serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina. O resíduo nucleofílico serina é localizado na extremidade C-terminal da fita $\beta 5$ num pentapeptídeo G-X₁-S-X₂-G (G=glicina, S=serina, X₁=histidina e X₂=ácido aspártico ou glutâmico) altamente conservado, formando uma característica “ β em torno de α ” ou “cotovelo nucleofílico”, chamada cavidade nucleofílica (JAEGER; REETZ, 1998).

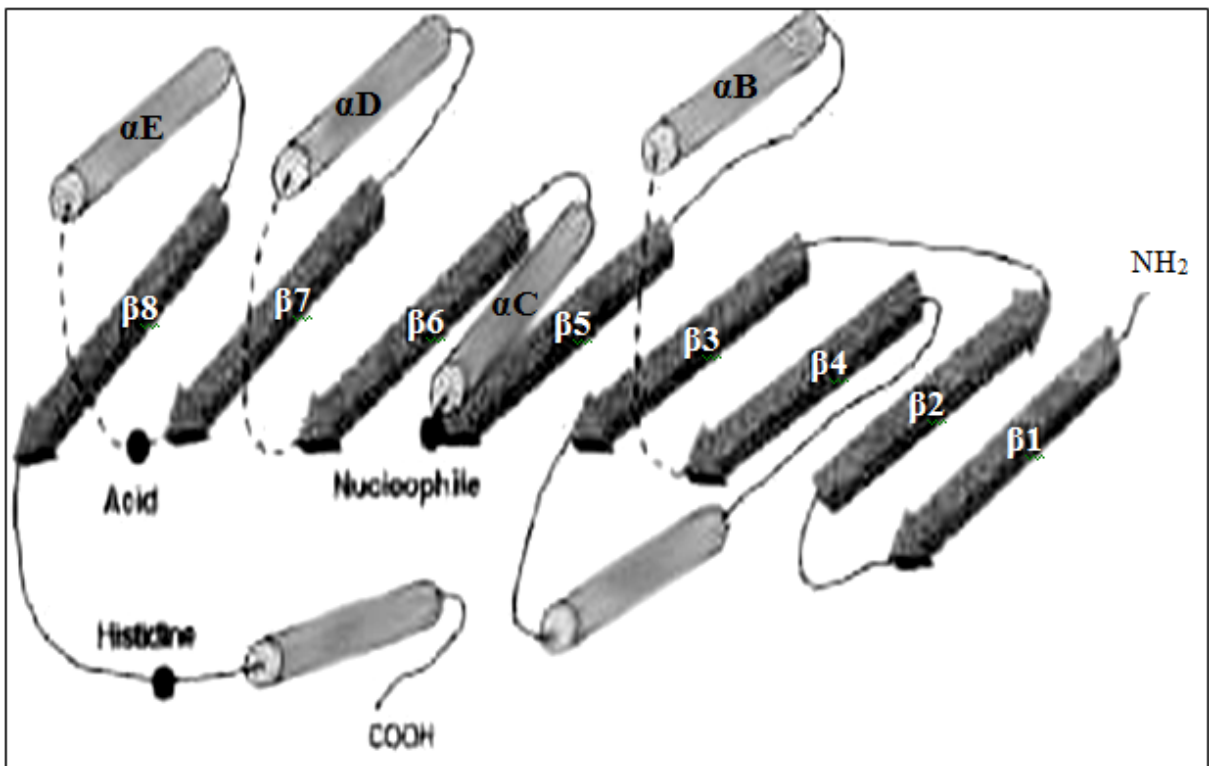


Figura 3.5 – Modelo estrutural de α/β hidrolases. Os cilindros representam as estruturas em α -hélices e as fitas em β , são representadas pelas setas
Fonte: Holmquist (2000)

3.1.5 Mecanismo de Lipólise e o Fenômeno da Ativação Interfacial

A hidrólise do substrato acontece em duas etapas (Figura 3.6): inicia-se com um ataque do oxigênio hidrofílico do grupo hidroxila do resíduo serina ao carbono da carbonila ativado do éster do lipídeo (3.6A). Um intermediário tetraédrico é formado, sendo o O⁻ estabilizado pela interação com dois grupos

peptídicos NH. A histidina doa um próton ao componente álcool que está deixando o substrato (3.6B).

Resta então um intermediário covalente (enzima acilada), estando o componente ácido do substrato esterificado pelo resíduo serina da enzima. Uma molécula de água é ativada pelo resíduo histidina na vizinhança e o íon hidroxila resultante, realiza um ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila do intermediário covalente (3.6C).

O resíduo de histidina doa um próton ao átomo de oxigênio do resíduo serina ativo, a ligação éster entre serina e componente acila é quebrada, liberando o produto acilado e a enzima fica pronta para receber uma nova molécula de substrato (3.6D) (JAEGER et al., 1994; JAEGER; REETZ, 1998; TREVISAN, 2004).

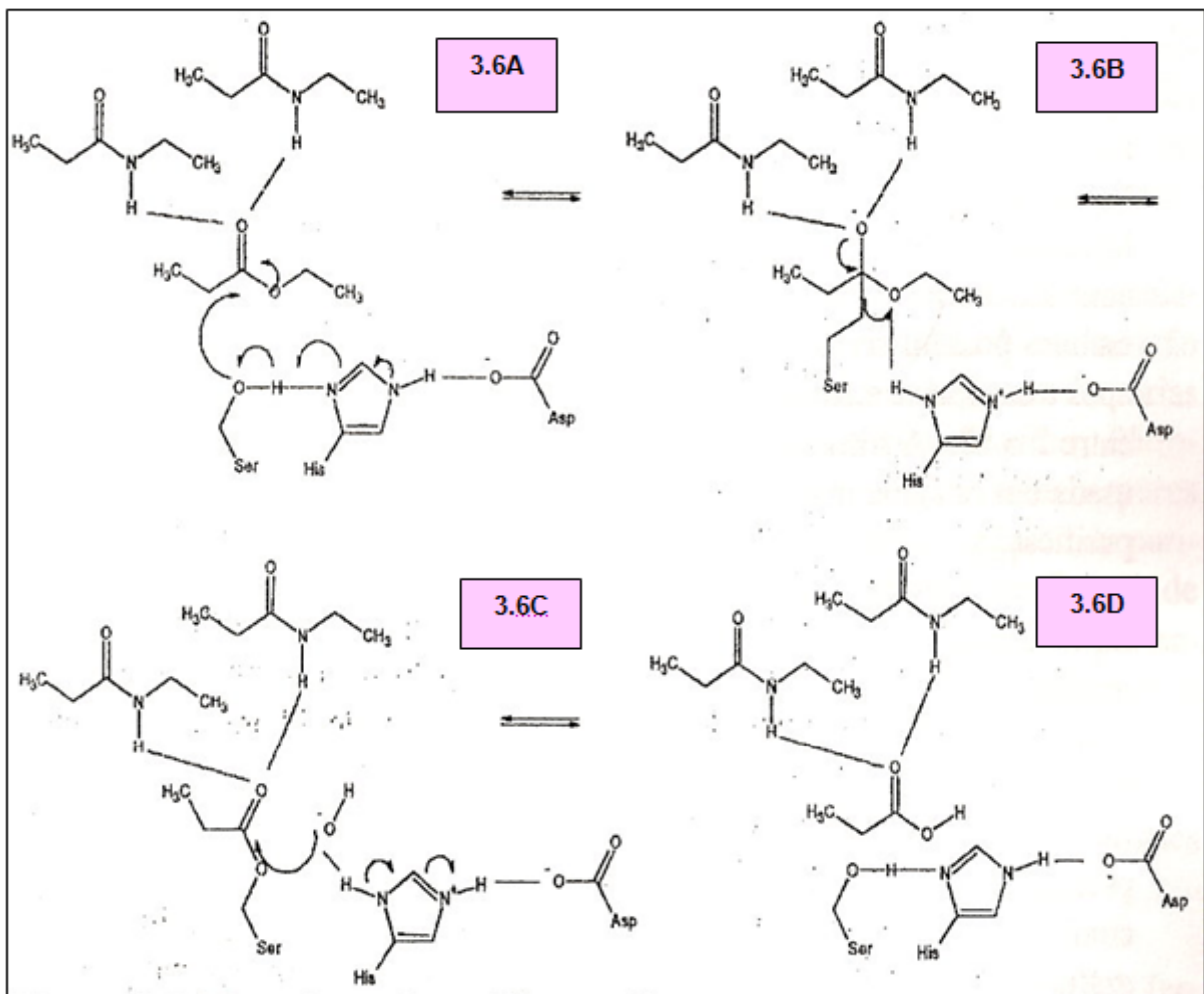


Figura 3.6 – Modelo catalítico proposto para as lipases
Fonte: Jaeger et al.(1994 apud TREVISAN, 2004)

O fenômeno mais conhecido originado de estudos cinéticos de reações lipolíticas é a “ativação interfacial”, que relaciona o aumento da atividade da lipase em função de substratos insolúveis, que formam emulsão. Ocorre, portanto, mudança na conformação da enzima (SAXENA et al., 2003).

As lipases exibem baixa atividade hidrolítica quando seus substratos (ésteres, por exemplo) são dissolvidos em meio aquoso e são monômeros. Um aumento da atividade é pronunciado quando a concentração do substrato atinge o limite de solubilidade e ocorre a separação da fase lipídica da fase aquosa. A Figura 3.7 ilustra a ação de lipases em substratos solúveis e insolúveis em água. O modelo é uma extensão do proposto por Verger, 1980 (HOLMQUIST, 2000).

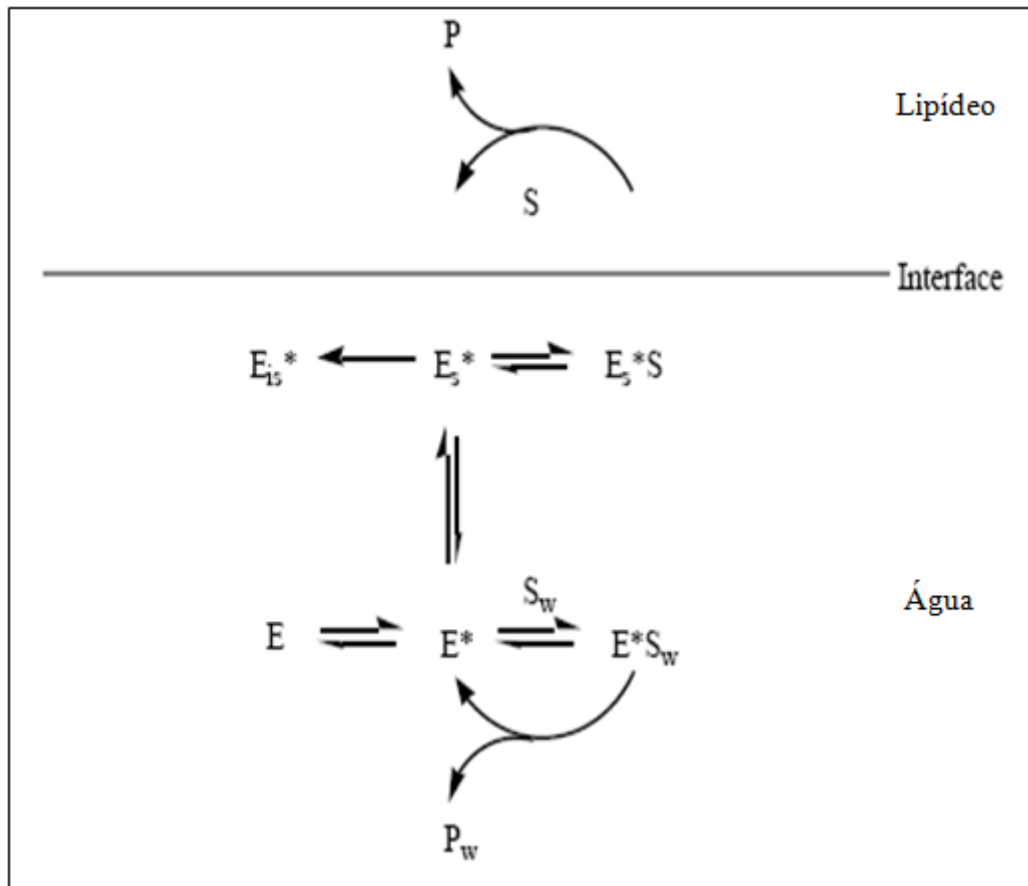


Figura 3.7 – Modelo da ação de lipase em substratos solúveis e insolúveis em água, com uma lipase que sofre mudança conformacional. E = lipase inativa dissolvida; E^* = lipase ativa dissolvida; E_s^* =lipase ativa adsorvida; E_{is}^* = lipase inativa adsorvida; S_w = substrato solúvel em água; S =substrato insolúvel em água; E^*S_w e E_s^*S = complexos lipase-substrato; P_w e P são os produtos de reação em água e na fase lipídica, respectivamente

Fonte: Holmquist (2000)

A determinação da estrutura tridimensional fornece, para determinadas lipases, uma compreensão para a ativação interfacial. O sítio ativo destas enzimas é coberto por uma cadeia peptídica denominada de “tampa ou lid” (ou borda), de natureza hidrofóbica (Figura 3.8A). Quando a tampa encontra uma interface lipídeo-água, há interação entre ambas e a enzima sofre uma alteração conformacional (a tampa se move alterando a forma fechada da lipase para a forma aberta), expondo o sítio ativo e permitindo a catálise (Figura 3.8B) (HOLMQUIST, 2000). O centro ativo fica acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, a lipase expõe uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação à interface (JAEGER; REETZ, 1998; SECUNDO et al., 2006). Nota-se, portanto, diferença de estrutura da lipase ativa e inativa, representadas a partir de estruturas em 3D (Figura 3.8C), obtidas por cristalografia de raio-X.

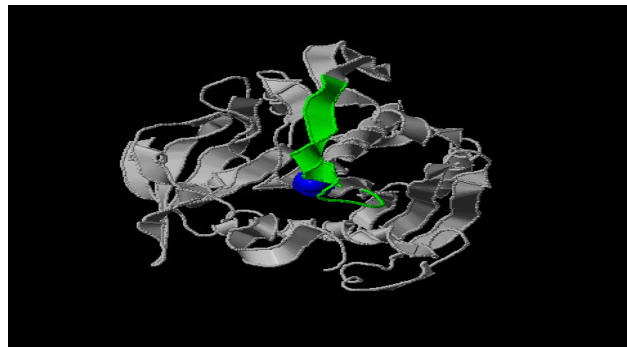


Figura 3.8 A – Conformação fechada da lipase de *Rhizomucor miehei*. A estrutura em azul representa o sítio ativo. A estrutura em verde representa a tampa

Fonte: Derewenda et al. (1992; THE UNIVERSITY OF ARIZONA, 2007)



Figura 3.8 B – Conformação aberta da lipase de *Rhizomucor miehei*. A estrutura em laranja representa a tampa aberta. A estrutura em amarelo representa o substrato ligado ao sítio ativo (em azul)

Fonte: Derewenda et al. (1992; THE UNIVERSITY OF ARIZONA, 2007)

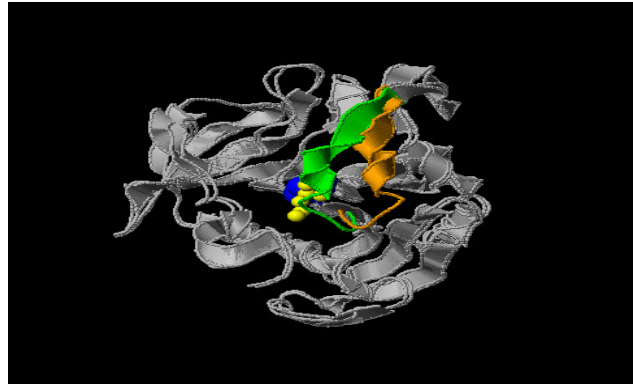


Figura 3.8 C – Comparação da posição da tampa na enzima livre (tampa em verde) e no complexo enzima-substrato (tampa em laranja)
Fonte: Derewenda et al. (1992; THE UNIVERSITY OF ARIZONA, 2007)

A lipase pancreática (Figura 3.9) de humanos é a enzima que mais está envolvida no processo de digestão de triglicerídeos da dieta. Quando *in vivo*, esta lipase age em triglicerídeos emulsificados na presença de concentrações de sais biliares. Acompanhando esta função, existe uma lipase específica, que atua como uma âncora (10 kDa), denominada colipase, que está também presente no suco pancreático. A colipase é essencial à catálise das reações em condições fisiológicas, onde o acúmulo de sais biliares altera a interface lipídeo-água e também serve para estabilizar a conformação aberta da lipase pancreática, que apresenta, portanto, um domínio extra para facilitar a catálise interfacial (HOLMQUIST, 2000).

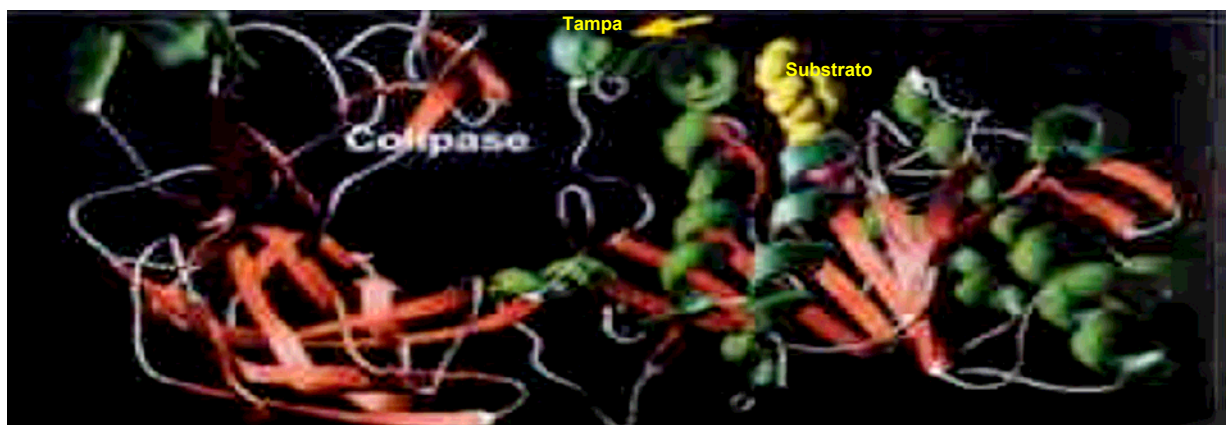


Figura 3.9 – Estrutura em 3D da lipase pancreática humana que apresenta um domínio extra representado pela colipase que ajuda na ancoragem do complexo colipase/lipase na interface lipídeo-água para a catálise interfacial. Estruturas em α -hélices e folhas β representadas pelas cores verde e vermelho, respectivamente

Fonte: Holmquist (2000)

Em 1997, Jaeger e colaboradores obtiveram um modelo estrutural em 3D para a lipase de *Pseudomonas aeruginosa* com a presença da tampa, seguindo o modelo da lipase de *Burkholderia glumae*, ambas obtidas por cristalografia de raio-X. Todavia, apesar de apresentarem a tampa em suas estruturas, não houve ativação interfacial (JAEGER; REETZ, 1998).

Determinadas lipases não apresentam o sítio ativo recoberto pela tampa e não precisam da interface para desempenhar sua atividade hidrolítica, como é o caso das cutinases, que são as menores lipases de estrutura conhecida e são encontradas em diversos microrganismos fitopatogênicos. Fungos como *Fusarium solani* e *Alternaria solani* são produtores de cutinases (CYGLER; SCHRAG, 1997; LONGHI et al., 1997; MARCHI; BORGES; MIZUBUTI, 2006).

Os trabalhos sobre mecanismos de adsorção das lipases e a catálise em sistemas heterogêneos relacionados às propriedades físico-químicas da interface, primordialmente foram reportados por Sarda e Desnuelle (1958). Estes demonstraram que a cinética de lipases em emulsões dependia da interface e que poderia seguir o modelo de Michaelis-Menten se o termo “concentração de substrato” fosse substituído pela área interfacial (apud LIMA, 2004; apud GHANEM, 2007).

Apesar desta relação entre a taxa de reação e a concentração de substrato por unidade de área da interface (em vez de volume) ser estabelecida, existe um problema em interpretar o valor do K_m (constante de Michaelis-Menten), que é mais uma estimativa da interação proteína-lipídeo do que da atividade da enzima (TREVISAN, 2004).

De acordo com Sharma e colaboradores (2001), as reações lipolíticas ocorrem na interface água-lipídeo e podem impedir que as cinéticas das reações enzimáticas sejam descritas pelas equações do tipo Michaelis-Menten, que só são válidas se a reação catalítica ocorrer em fase homogênea.

3.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES

As enzimas lipolíticas apresentam entre si grandes diferenças, seja pela origem de obtenção (animal, vegetal, microbiana), seja pelas propriedades de catálise perante diferentes substratos (SHARMA et al., 2001; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

As lipases de origem microbiana são comercialmente significantes (JAEGER; REETZ, 1998; SHARMA et al., 2001) e existe inclusive, um grande número de cepas e linhagens utilizadas para a produção industrial (JAEGER; REETZ, 1998). A Tabela 3.1 ilustra algumas destas lipases disponíveis:

Tabela 3.1 – Algumas lipases microbianas comercialmente disponíveis

Tipo	Fonte	Companhia Produtora
Bacteriana	<i>Burkholderia cepacia</i>	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Genencor
Fúngica	<i>Candida rugosa</i>	Amano, Biocatalysts, Boehringer
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano

Fonte: Jaeger; Reetz (1998)

Em 1994, a Novo Nordisk introduziu a primeira lipase comercial recombinante denominada “lipolase”, oriunda do fungo *Thermomyces lanuginosus* e expressada em *Aspergillus oryzae* (JAEGER; REETZ, 1998).

Abaixo, na Tabela 3.2, estão listados diversos microrganismos produtores de lipases. A literatura de patentes contém exemplos de muitas lipases microbianas que são apropriadas para uso em detergentes (SHARMA et al., 2001).

Tabela 3.2 – Microrganismos produtores de lipases relatados na literatura científica (1965 até início de 2009)

Fonte	Gêneros	Espécies	Referências	
Arqueobactérias	<i>Natronococcus</i>	<i>Natronococcus</i> sp.	Boutaiba et al., 2006	
Bactérias (Gram-positivas)	<i>Bacillus</i>	<i>B. stearothermophilus</i> <i>Bacillus</i> sp. <i>B. megaterium</i>	Gowland et al., 1987 Helisto; Korpela, 1998 Lima et al., 2004b	
	<i>Burkholderia</i>	<i>B. glumae</i> <i>B. cepacia</i>	Khattabi et al., 2003 Fernandes et al., 2007	
	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. xylosus</i>	Shah; Wilson, 1965 Joseph; Ramteke; Kumar, 2006 Mosbah et al., 2007	
		Bactérias (Gram-negativas)	<i>Chromobacterium</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>Ch. viscosum</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>P. mendocina</i> <i>P. fluorescens</i>
<i>Serratia</i>		<i>S. marcescens</i>	Jaeger et al., 1997	
Actinomicetos	<i>Streptomyces</i>	<i>S. cinnamomeus</i> <i>S. coelicolor</i> A3(2)	Sommer et al., 1997 Côté; Shareck, 2008	
Fungos leveduriformes	<i>Aureobasidium</i>	<i>A. pullulans</i> HN2.3	Liu et al., 2008	
	<i>Candida</i>	<i>C. rugosa</i> <i>C. cylindracea</i> <i>Candida</i> sp 99-125 <i>Torulopsis ernobii</i>	Shih et al., 2007 Muralidhar et al., 2001 He; Tan, 2006 Yoshida; Motai; Ichishima, 1968	
		<i>Geotrichum</i>	<i>Geotrichum</i> sp	Burket et al., 2005
		<i>Issatchenkia</i>	<i>I. orientalis</i>	Costas; Deive; Longo, 2004
		<i>Yarrowia</i>	<i>Y. lipolytica</i>	Alonso et al., 2005
	Fungos filamentosos	<i>Antrodia</i> <i>Alternaria</i>	<i>A. cinnamomea</i> <i>Alternaria</i> sp.	Lin; Wang, Sung, 2006 Tom; Crisan, 1975

<i>Aspergillus</i>	<i>A. carneus</i>	Saxena et al., 2003
	<i>A. terreus</i>	Gulati et al., 1999
	<i>Aspergillus</i> sp.	Cihangir; Sarikaya, 2004
	<i>A. niger</i>	Pera et al., 2006
	<i>A. oryzae</i>	Toida et al., 2000
<i>Beauveria</i>	<i>B. bassiana</i>	Hegedus; Khachatourians, 1988
<i>Botrytis</i>	<i>B. cinerea</i>	Comménil et al., 1999
<i>Botryosphaeria</i>	<i>Botryosphaeria</i> sp. NN143554 e	
	<i>B. ribis</i> NN115210	Novo Nordisk A/S, 2008 (Hirayama; Halkier, 1996)
	<i>B. ribis</i> EC-01	Este trabalho, 2008; Messias et al., 2009
<i>Cryptococcus</i>	<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	Kamini et al., 2000
<i>Cunninghamella</i>	<i>C. verticillata</i>	Gopinath et al., 2002
<i>Fusarium</i>	<i>F. globulosum</i>	Gulati et al., 2005
	<i>F. oxysporum</i>	Prazeres; Cruz; Pastore, 2006
<i>Mucor</i>	<i>M. circinelloides</i>	Szczesna-Antczak et al., 2006
<i>Penicillium</i>	<i>P. aurantiogriseum</i>	Lima et al., 2003 e 2004a
	<i>P. citrinum</i>	Miranda et al., 1999
	<i>P. restrictum</i>	Cammarota; Freire, 2006
	<i>P. simplicissimum</i>	Gutarra et al., 2007
	<i>P. verrucosum</i>	Kempka et al. 2008
<i>Rhizomucor</i>	<i>R. miehei</i>	Jaeger; Reetz, 1998
<i>Rhizopus</i>	<i>R. delemar</i>	Derewenda et al., 1994
	<i>R. chinensis</i>	Sun; Xu, 2009
	<i>R. oryzae</i>	Hama et al., 2006
	<i>R. homothallicus</i>	Diaz et al., 2006
	<i>R. arrhizus</i>	Li; Wang; Tan, 2006
<i>Thermomyces</i>	<i>T. lanuginosa</i>	Fernandes et al., 2004
<i>Trichoderma</i>	<i>T. viride</i>	Kashmiri; Adnan; Butt, 2006
	<i>T. pseudokoningii</i>	Tristão et al., 2007

3.2.1 Produção de Lipases por Fungos Filamentosos

Os fungos são responsáveis pela produção de ácidos orgânicos, fármacos, enzimas de interesse industrial (celulases, lacases, xilanases, pectinases, amilases e lipases) de elevado valor econômico, participam do controle biológico de insetos-pragas da agricultura e da produção do etanol. Também tornam a vida no planeta mais agradável, isto porque se não fossem os fungos, não existiriam queijos dos mais diversos tipos, bebidas fermentadas como as cervejas e vinhos etc (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Uma maior aplicação industrial das lipases fúngicas possivelmente ocorrerá pelo melhoramento dos processos de produção e de purificação, todavia, no momento, ainda possuem um custo elevado. A melhora da produção poderá ser conduzida a partir da descoberta de novos microrganismos produtores; do melhoramento genético dos já utilizados; de alterações no modo de condução da fermentação e de modificações na composição dos meios de cultivo, com utilização de substratos de baixo custo (GOMES; FREIRE, 2003).

As lipases são comumente produzidas por fermentação submersa. O extrato livre de células é utilizado para os estudos enzimáticos e o crescimento fúngico é quantificado após secagem da biomassa por gravimetria (MIRANDA et al., 1999; KAMINI et al., 2000; LIN et al., 2006).

As enzimas lipolíticas também podem ser produzidas por fermentação em fase sólida. Neste processo, são utilizados substratos insolúveis com baixas porcentagens de água em sua composição. Tais substratos atuam tanto como fonte de nutrientes como suporte fisiológico (PANDEY, 2003). Existem vantagens e desvantagens da fermentação sólida (Tabela 3.3) quando comparada com a fermentação submersa, para a produção de enzimas (BIANCHI et al., 2001).

De acordo com Mahadik e colaboradores (2002), a fermentação sólida pode auxiliar na obtenção de lipases com atividade a pH extremamente ácido, como a produzida pelo fungo *Aspergillus niger* (pH de 1,5 a 2,5). Diaz e colaboradores (2006) obtiveram uma lipase de *Rhizopus homothallicus* mais termoestável do que a obtida por fermentação submersa.

Tabela 3.3 – Comparação entre fermentação sólida e submersa

Vantagens e Desvantagens		
Fermentação em fase sólida	X	Fermentação submersa
Vantagens:		Vantagens:
<ul style="list-style-type: none"> ▶ meio de cultivo de baixo custo (rejeitos agroindustriais) ▶ menor probabilidade de contaminação ▶ condições mais próximas ao habitat natural do fungo ▶ enzimas extracelulares mais concentradas ▶ equipamentos com pouca complexidade 		<ul style="list-style-type: none"> ▶ sistema homogêneo ▶ transferência de calor mais eficiente ▶ aspectos do processo mais conhecidos ▶ monitoramento e controle de parâmetros facilitados (pH, temperatura etc) ▶ facilidade de automação ▶ menos intensa em mão de obra
Desvantagens:		Desvantagens:
<ul style="list-style-type: none"> ▶ sistema heterogêneo ▶ monitoramento e controle de parâmetros dificultados ▶ mais intensa em mão de obra 		<ul style="list-style-type: none"> ▶ enzimas extracelulares mais diluídas ▶ maior probabilidade de contaminação

Fonte: Bianchi et al. (2001)

Na formulação do meio de cultivo para a fermentação sólida, várias são as fontes de carbono utilizadas para a nutrição fúngica. Há produção de lipase por *Penicillium restrictum* (GOMBERT et al., 1999; PALMA et al., 2000) e por *Penicillium simplicissimum* (GUTARRA et al.; 2005; GUTARRA et al., 2007) utilizando torta de óleo de babaçu, por *Aspergillus niger* utilizando torta de óleo de gergelim (KAMINI et al., 1998) ou farelo de trigo enriquecido com concentrações variáveis de glucose e óleo de oliva como o indutor da enzima (FALONY et al., 2006). Mala e colaboradores (2007) misturaram farelo de trigo com torta de gergelim para o *A. niger* MTCC 2594 produzir lipase. Rodrigues e colaboradores (2006) utilizaram bagaço de cana e óleo de oliva como fonte de carbono para a produção da enzima pelo *Rhizopus homothallicus*.

Como a fermentação submersa detém aspectos de engenharia dominados e desenvolvidos, a produção de lipases fúngicas, majoritariamente está associada com este processo fermentativo. A produção da enzima normalmente está associada ao crescimento do microrganismo e, conseqüentemente está também relacionada com as variações da composição e condições (Tabela 3.4) do cultivo (KRIEGER, 1995 apud LIMA, 2000).

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LIPASES

Os ácidos graxos liberados pela hidrólise mediada por lipases podem ser determinados qualitativamente por ensaios de gel-difusão e quantitativamente (BEISSON et al., 2000; GUPTA et al., 2003) usando titulometria, ensaios colorimétricos, fluorescência, procedimentos cromatográficos (cromatografia gasosa (CG)/cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)), tensiometria interfacial e métodos imunológicos.

3.3.1 Métodos Qualitativos para Selecionar Microrganismos Produtores de Lipase Extracelular

Microrganismos de uma vasta população potencialmente produtora de enzimas lipolíticas são convencionalmente selecionados em placas de Petri contendo ágar-tributirina (Figura 3.10). A zona de hidrólise da tributirina é um indicativo de atividade de lipase ou esterase (BECKER et al., 2005).

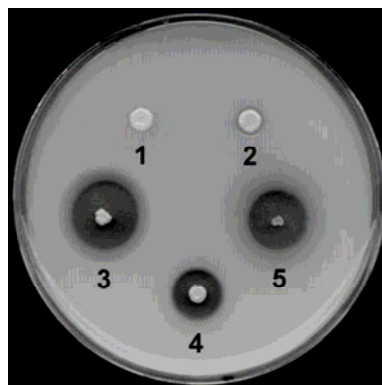


Figura 3.10 – Produção de lipase em *Escherichia coli* com genes de lipases de (3) *Bacillus subtilis*, (4) *Serratia marcescens* e (5) *Fusarium solani pisi* indicada pela formação de halos lípidos ao redor das colônias

Fonte: Becker et al. (2005)

Tabela 3.4 – Comparação de meios e parâmetros de cultivo para a produção de lipases por alguns fungos filamentosos

Microrganismo	Tempo de cultivo (horas ou dias)	pH inicial	Temp (°C)	Agit. (rpm)	Macro e Microelementos	Fonte de carbono	Fonte de Nitrogênio	Fonte de Fosfato	Referências
<i>Antrodia cinnamomea</i>	17 d	5,5	25	150	MgSO ₄ .7H ₂ O (1,0 g/L), tiamina (1,0 g/L)	Glicerol (5,0%, v/v), glucose (50,0 g/L)	NaNO ₃ (0,5%, m/v) ext. leved. (3,0 g/L), ext. malte (3,0 g/L), triptona (5,0 g/L)	KH ₂ PO ₄ (1,0 g/L)	Lin; Wang, Sung, 2006
<i>Antrodia cinnamomea</i>	14 d	-	28	150	-	Glucose (50,0 g/L)	Ext. malte (20,0 g/L), peptona (1,0 g/L)	-	Lin; Ko, 2005
<i>Aspergillus carneus</i>	92 h	8,0	37	250	Meio mínimo de Aisaka e Terada (1980) modificado	Óleo de girassol (1,5 %), glucose (1,0%)	Peptona (0,5%)	KH ₂ PO ₄ (0,25%)	Saxena et al., 2003
<i>Aspergillus niger</i>	70 h	5,0	30	400	MgSO ₄ .7H ₂ O (0,1%)	Óleo de oliva (2,0%), amido (0,1%)	NH ₄ NO ₃ (0,1%)	KH ₂ PO ₄ (0,1%)	Pokorny; Cimerman; Steiner, 1997
<i>Aspergillus terreus</i>	96 h	6,2	37 ± 1	Ausente	Meio mínimo Czapek Dox modificado	Glucose (2,0%) óleo de oliva (1,5%, v/v)	NaNO ₃ (6,0 g/L)	KH ₂ PO ₄ (1,52 g/L)	Gulati et al., 1999
<i>Aspergillus terreus</i>	54 e 96 h	9,0	37	250	MgSO ₄ .7H ₂ O (0,52 g/L), KCl (0,52 g/L), Cu(NO ₃) ₂ .H ₂ O (0,001 g/L), FeSO ₄ . 7H ₂ O (0,001 g/L), caseína (1,0 g/L), CaCl ₂ .2H ₂ O (1,0 mmol/L), MgCl ₂ (1,5 mmol/L)	Óleo de milho (2,0%, v/v), glucose (2,0 g/L)	NaNO ₃ (2,0 g/L)	KH ₂ PO ₄ (1,52 g/L)	Gulati; Saxena; Gupta, 2000

Continuação da Tabela 3.4

<i>Fusarium globulosum</i>	96 h	6,2	25 ± 1	Ausente	MgSO ₄ .7H ₂ O (0,52 g/L), KCl (0,52 g/L), Cu(NO ₃) ₂ .H ₂ O (0,001 g/L), FeSO ₄ . 7H ₂ O (0,001 g/L)	Glucose (2 g/L), óleo de nim (extraído da árvore Amargosa (<i>Azadirachta indica</i>)) (15 mL/L)	NaNO ₃ (2 g/L)	KH ₂ PO ₄ (1,52 g/L)	Gulati et al., 2005
<i>Fusarium oxysporum</i>	72 h	6,0	30	160	MgSO ₄ .7H ₂ O (0,04%)	Óleo de oliva (1,0%)	Peptona (1,5%), ext. de levedura (0,5%)	KH ₂ PO ₄ (0,3%)	Prazeres; Cruz; Pastore, 2006
<i>Fusarium solani</i>	72 h	6,0	25	120	MgSO ₄ .7H ₂ O (0,5 g/L)	Glucose (1,0%), óleo de oliva (1,0%)	NaNO ₃ (3 g/L), peptona (30 g/L)	KH ₂ PO ₄ (1,0 g/L)	Maia et al., 1999
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	72 h	-	29	120	MgSO ₄ .7H ₂ O (0,5 g/L), ZnSO ₄ . 7H ₂ O (0,44 g/L), FeSO ₄ . 7H ₂ O (1,12 g/L)	Óleo de oliva (1,0%, v/v)	KNO ₃ (2,0 g/L), (NH ₄) ₂ SO ₄ (12,5 g/L)	KH ₂ PO ₄ (1,0 g/L)	Lima et al., 2004a
<i>Penicillium citrinum</i>	28 e 52 h	5,5 e 8,5	28- 30	100	-	Resíduo oleoso de refinaria (1,6%) e óleo de oliva (1,0%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ , NH ₄ Cl ou Uréia (0,75%)	-	Miranda et al., 1999
<i>Penicillium cyclopium</i>	6 dias	6,0	25	Presente ou ausente	-	Ausência ou presença de óleo de oliva (1,0%)	Água de maceração do milho (2,0%)	-	Chahinian et al., 2000
<i>Rhizopus nigricans</i>	5 dias	6,0	30	Ausente	NaCl (0,5%)	Glucose (1,0%)	Peptona (2,0%), ext. levedura (0,5%)	-	Chander et al., 1981
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	-	9,0	-	-	Meio de Adams (1990)	Tween 20 (0,25%)	-	-	Tristão et al., 2007
<i>Trichoderma viride</i>	48 h	-	30±1	100	MgSO ₄ .7H ₂ O (0,25 g/L), CaCO ₃ (5,0 g/L)	Óleo de oliva (20 g/L) emulsificado em goma acácia (2,0%),	Gema de ovo (10 g/L), NH ₄ Cl (4,0 g/L)	KH ₂ PO ₄ (0,5 g/L)	Kashmiri; Adnan; Butt, 2006

Kouker e Jaeger (1987) empregaram o corante Rodamina B para observar a zona de lipólise ao redor do crescimento microbiano sendo uma fluorescência laranja sob luz UV a 350 nm. O meio de cultivo sólido, além da Rodamina, continha trioleína ou óleo de oliva como fonte de carbono. Após a hidrólise, os ácidos graxos livres formaram um complexo com a Rodamina (Figura 3.11) (SHARMA et al., 2001; GUPTA et al., 2003; LIMA, 2004; PERA et al, 2006; PETERSEN; DANIEL, 2006).



Figura 3.11 – Zonas fluorescentes (350 nm) ao redor de colônias de *Bacillus megaterium* indicando atividade lipolítica
Fonte: Lima (2004)

Existe também o teste qualitativo com adição de Tween 80 ao meio de cultivo sólido. A formação de zonas opacas ao redor da colônia indica atividade de lipase ou esterase (SHARMA et al., 2001).

Tom e Crisan (1975) realizaram o teste da tributirina e do Tween 80 em placas de Petri e substituíram a fonte de carbono por substratos marinhos, como o óleo de peixe menhadem. Resultados positivos de lipólise foram encontrados em bactérias do gênero *Bacillus* (*B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* e *B. subtilis*), *Micrococcus* (*M. colpogenes*, *M. flavus*, *M. varians*), *Serratia* (*S. indica*) e *Staphylococcus* (*S. aureus*). Também houve atividade de lipase em fungos filamentosos como *Alternaria* spp., *Penicillium* spp., e na levedura *Geotrichum candidum*.

3.3.2 Métodos Quantitativos para Determinar a Atividade de Lipases

Dentre os vários métodos disponíveis para acompanhar a atividade de lipase presente no meio fermentativo, os mais citados são os colorimétricos que utilizam substratos sintéticos (ésteres de *p*-nitrofenila, por exemplo) e o titulométrico que usa a trioleína como substrato padrão para a atividade lipolítica e o óleo de oliva que é uma alternativa barata, pois contém em média 70,0 % de trioleína (JENSEN, 1983 apud GUPTA, 2003). Em relação a estas metodologias, as características cinéticas e físico-químicas das lipases bacterianas, assim como as das fúngicas, serão abaixo discutidas.

3.4 CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DAS LIPASES MICROBIANAS

3.4.1 Lipases Bacterianas

As enzimas lipolíticas bacterianas foram detectadas há mais de um século e eram agrupadas como pertencentes ao gênero *Bacillus* (*B. prodigiosus*, *B. pyocyaneus* e *B. fluorescens*), hoje identificadas como *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens* (JAEGER et al., 1994).

A temperatura ótima para a atividade de lipases bacterianas varia imensamente dependendo do gênero, espécie e cepa. Valores médios encontram-se na faixa de 40 a 70 °C, com é o caso da lipase de *Bacillus megaterium*, que apresenta temperatura ótima de reação a 55,0 °C (LIMA et al., 2004b). Algumas bactérias possuem lipases com atividade máxima acima dos 70 °C, como as de *Bacillus thermoleovorans* ID-1 (CHO; YOO; KIM, 2000), *Bacillus stearothermophilus* MC 7 (KAMBOUROVA et al., 2003), chegando até mesmo aos 90 °C, como é o caso da carboxilesterase produzida pela Arqueobactéria *Pyrobaculum calidifontis* (HOTTA et al., 2002).

A termoestabilidade é uma das características requeridas para as enzimas visando a aplicação industrial, pois, muitos processos utilizam temperaturas

ao redor de 50 °C. Particularmente, lipases oriundas de bactérias termofílicas desempenham um papel importante na indústria pois normalmente apresentam alta estabilidade termodinâmica em altas temperaturas (JAEGER; REETZ, 1998).

Não existe um protocolo padrão para determinar a termoestabilidade das lipases microbianas, o que dificulta a comparação entre elas. A lipase da bactéria halofílica *Natronococcus* sp. quando incubada durante 60 minutos e a 50 °C, permaneceu com 90 % da atividade residual (BOUTAIBA et al., 2006); a enzima lipolítica de *Clostridium tetanomorphum*, por exemplo, ficou ativa até 65 °C (PETERSEN; DANIEL, 2006); a lipase SCO1725 de *Streptomyces coelicolor* A3(2) durante 30 minutos de incubação e a 70 °C ainda apresentou atividade residual em torno de 60 a 80 % (CÔTÉ; SHARECK, 2008); a 100 °C e durante duas horas, a carboxilesterase de *Pyrobaculum calidifontis* (HOTTA et al., 2002) manteve constante sua atividade.

Boa parte das lipases bacterianas atua em pH alcalino. Isto é observado, por exemplo, para espécies como *Bacillus stearothermophilus* MC7 (pH 7,5-9,0) (KAMBOUROVA et al., 2003), *Pseudomonas fluorescens* HU380 (pH 8,5) (KOJIMA; SHIMIZU, 2003) *Staphylococcus aureus* B56 (pH 8,0-8,5) (JUNG et al., 2002), *Staphylococcus xylosus* (pH 8,5) (MOSBAH et al., 2007). Existem também enzimas que atuam numa ampla faixa de pH, como a lipase de *Staphylococcus epidermidis* (pH entre 2,0 e 10,0) (SIMONS et al., 1998) e *Bacillus megaterium* (pH entre 4,0 e 12,0) (RUIZ et al., 2002). Já a lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 apresentou atuação numa faixa de pH mais restrita (entre 5,0 e 7,0) (LIMA et al., 2004b).

De um modo geral, a massa molecular das enzimas lipolíticas varia entre 20 – 60 kDa (apud LIMA, 2004; MALA; TAKEUCHI, 2008). A lipase de menor estrutura conhecida pertence à bactéria anaeróbica *Propionibacterium acidipropionici* que apresenta uma pequena massa molecular entre 6,0-8,0 kDa (SARADA; JOSEPH, 1992). Uma exceção de massa molecular mais alta, por exemplo, pode ser representada pelas lipases das bactérias psicrótróficas isoladas de sedimentos de mar profundo do oeste Pacífico, *Psychrobacter* sp. wp 37 e *Pseudoalteromonas* sp. wp 27, que apresentam massa molecular em torno de 85 kDa (ZENG et al., 2004).

3.4.2 Lipases Fúngicas

Apesar da grande quantidade de lipases fúngicas descritas nos artigos científicos, poucas espécies produzem a enzima com atividade e estabilidade plenamente satisfatórias em reações de biocatálise aplicadas na indústria (MARGOLIN, 1993). A Tabela 3.5 apresenta fungos produtores de lipases e a variação da atividade lipolítica entre as espécies. Também mostra as características cinéticas e físico-químicas destas lipases fúngicas. Portanto, é possível comparar as atividades de lipases listadas, embora os métodos e condições para a determinação da atividade da enzima possam variar.

3.5 MELHORAMENTO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS COM O AUXÍLIO DO PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO DE MISTURAS, DO DELINEAMENTO FATORIAL E DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Quando é necessário desenvolver ou melhorar um processo, busca-se planejar um procedimento experimental para avaliar os efeitos que suas variáveis independentes ou fatores têm sobre a resposta desejada. Determinar as condições ótimas avaliando separadamente os fatores nem sempre é o melhor caminho, pois se existirem interações entre as variáveis, o método pode não encontrar uma solução ótima para o problema experimental por não explorar completamente o “espaço” de soluções. A resolução do problema através de um planejamento estatístico conhecido como planejamento fatorial, além de explorar todo o espaço experimental, permite um número menor de experimentos realizados quando comparado ao estudo de uma variável por vez (“one-at-a-time”) (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Tabela 3.5 – Características cinéticas e físico-químicas de lipases fúngicas

Microrganismo	Substratos	Temp. (°C) reação	pH da reação	Tampão	Atividade lipase	Estabilidade pH (% atividade residual)	Estabilidade Temp. (°C) (% ativ. res.)	Massa mol. (kDa)	Referências
<i>Antrodia cinnamomea</i>	pNPP ^a	50	9,0	Tris/HCl 0,05 mol/L	3,35 e 6,17 mU/mL	100,0 (pH 7,0-12,0 / 25,0 °C / 1h)	100,0 (20,0-80,0 °C / 2 h)	-	Lin; Ko, 2005
	Óleo de oliva ^b	37	7,0						
<i>Aspergillus carneus</i>	Óleo de oliva ^b	37	9,0	Fosfato 0,1 mol/L	7200 U/L (Ext. bruto) 2765 U/L (Octyl Sepharse)	90,0-100,0 (pH 8,0-10,0 / 24 h)	100,0 (70,0 °C / 5 min.) 55,0 (70,0 °C / 10 min.)	27 ± 1	Saxena et a., 2003
<i>Aspergillus niger</i> MZKI A116	Tributirina ^b Triacetina ^b	45	7,0	**	4,0-5,0 U/mL	pH 5,0-11,0	↓ > 55,0 °C	43 - 65	Pokorny; Cimerman; Steiner, 1997
<i>Aspergillus niger</i> MYA 135	pNPP ^a	30-35	6,5	Fosfato 0,1 mol/L	1,0-1,5 mU/μg	100,0 (pH 2,0- 10,0 / 1 h / 37 °C)	↑ 27 (37,0 °C / 1 h) ↑ 14 (40,0 °C / 1 h)	-	Pera et al., 2006
<i>Aspergillus terreus</i>	pNPP ^a Óleo de oliva ^b	37	9,0	*	14200 U/L	-	-	-	Gulati; Saxena; Gupta, 2000
<i>Candida rugosa</i>	Trioleína ^b	42	7,4	Tris/HCl 0,2 mol/L	6,0 U/mL	-	-	-	Dalmau et al., 2000
<i>Cunninghamella verticillata</i>	pNPP ^a	37	8,0	Fosfato 0,05 mol/L	850 U/mL (Ext. bruto)	-	-	42	Gopinath et al., 2002
	Trioleína ^b	40	7,0	Tris/HCl 0,05 mol/L	281 U/mL (Sephadex G-100)				

<i>Cryptococcus sp. S-2</i>	Laurato de p-nitrofenila ^a Óleo de oliva ^b	37	7,0	Fosfato 0,05 mol/L	65,7 U/mL	80,0-100,0 (pH 5,0-9,0)	71,1 (60,0 °C / 30 min.)	22	Kamini et al., 2000
<i>Fusarium oxysporum</i>	pNPP ^a	40	8,0	Tris/HCl 0,4 mol/L	40,0-60,0 U	80,0 (5,0-11,0 / 26 h / 30 °C)	93,0 (60,0 °C / 1 h)	-	Prazeres; Cruz; Pastore, 2006
	Óleo de oliva ^b	50	8,0	Tris/HCl 0,5 mol/L					
<i>Fusarium solani</i> FS1	pNPP ^a	30	8,6	*	10,5 U/L	80,0 (pH 7,6-8,6)	70,0-80,0 (30,0-40,0 °C / 1 h)	-	Maia et al., 1999
<i>Issatchenkia orientalis</i>	Óleo de oliva ^b	30	7,0	Tris/HCl 0,005 mol/L	70,0-80,0 U/mL	-	-	-	Costas; Deive; Longo, 2004
	Tributirina ^b								
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	pNPP ^a	37	7,0	Fosfato de sódio 0,05 mol/L	25,0 U/mL	-	-	-	Lima et al., 2003
	Trioleína ^b								
	Tributirina ^b								
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	pNPP ^a	37	8,0	Fosfato de sódio 0,05 mol/L	36,0 U/mL	80,0 (pH 6,0-9,0 / 28,0 °C / 1 h)	100,0 (28,0 °C / 3 h)	-	Lima et al., 2004a
	Óleo de oliva ^b								
	Tributirina ^b								
<i>Penicillium cyclopium</i>	Tributirina ^b	25	7,0	Tris 0,0025 mol/L	35,0- 40,0 U/mL	100,0 (pH 4,5-7,0) 40,0 (pH 8,0) 0,0 (pH 9,0)	25,0-40,0 °C	37-43	Chahinian et al., 2000
	Dicaprilina ^b								
<i>Rhizopus oryzae</i>	Tricaprilina ^b	30	8,5	Tris/HCl 0,1 mol/L	3500-4000 IU/g	-	0,0 (45,0 °C)	-	Essamri; Deyris; Comeau, 1998
<i>Rhizopus oryzae</i>	Óleo de oliva ^b	40	7,0	Fosfato de potássio, 0,1 mol/L	14,38 U/mL	-	-	-	Fadiloglu; Erkmén, 1999

Atividade de lipase determinada colorimétrica^a e titulometricamente^b

* WINKLER; STUCKMANN, 1979 - ** Novo Industry Analytical Method AF 95/5-GB

Para estudar o efeito de qualquer fator sobre uma determinada resposta, é preciso manipulá-lo, ou seja, fazê-lo mudar de nível (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007). Os experimentos fatoriais podem ser de dois níveis (2^k) e são utilizados na triagem de fatores, ou seja, quando não se sabe muito a respeito do modelo que será aplicado. Os níveis das variáveis independentes são representados de maneira codificada em -1 e +1. É possível ainda adicionar pontos centrais, os quais permitem a estimativa do erro, sendo muito úteis quando não há repetição dos pontos fatoriais (MONTGOMERY, 2005).

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma técnica de “otimização” baseada em planejamentos fatoriais que foi introduzida por G. E. P. COX (1950) e desde então, tem sido utilizada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais. A MSR apresenta duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. A primeira etapa é realizada através do ajuste de modelos simples (lineares ou quadráticos) em razão das respostas obtidas com planejamentos fatoriais. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um modelo, ou seja, onde a resposta de interesse varia de forma mais pronunciada (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007).

Para a produção de lipases por microrganismos, tanto o delineamento fatorial quanto a metodologia de superfície de resposta tem sido utilizados. Variáveis como quantidade de inóculo, tempo de cultivo, pH inicial do meio, fonte de nitrogênio, fonte de fosfato e aeração são amplamente exploradas nos artigos publicados (GOBBETTI et al., 1999, MURALIDHAR et al., 2001, LIU; LU; CHANG, 2006, HE; TAN, 2006, TENG; XU, 2008).

Até o momento, não existem relatos na literatura nacional e internacional sobre a aplicação de planejamento estatístico de misturas para a melhora da produção de lipases por microrganismos.

Um delineamento fatorial 2^5 foi realizado para melhorar a produção de lipase por *Candida cylindracea*. Foram utilizadas duas diferentes fontes de carbono (glucose e óleo de oliva) e juntamente para cada uma das fontes foram avaliadas, e simultaneamente otimizadas, as variáveis: extrato de levedura, extrato de malte, peptona e tween 80. A produção ótima de lipase foi 17,30 U/mL usando-se glucose e 47,25 U/mL, utilizando-se óleo de oliva como fontes únicas de carbono (MURALIDHAR et al., 2001). Os resultados deste trabalho mostram que a lipase produzida por esta levedura não é regulada por glucose.

MSR foi empregada para estudar os efeitos da fonte de carbono (óleo de soja, óleo de oliva e glucose) e concentrações da fonte de nitrogênio (milhocina[®] e NH₄NO₃) na produção de lipase por *Geotrichum* sp. A MSR foi aplicada para otimizar a concentração dos nutrientes no meio de cultura para a produção da enzima a 30 °C. A composição otimizada do meio para a produção de lipase (20 U/mL) por *Geotrichum* sp. foi NH₄NO₃ (de 2,1 a 2,5%), milhocina[®] (de 13 a 15%) e óleo de soja (0,6%) como fonte de carbono (BURKET; MAUGERI; RODRIGUES, 2004).

A produção de lipase extracelular por *Aspergillus carneus* foi estudada por MSR e pelo método de uma variável por vez. Para a MSR, interações de cinco diferentes variáveis foram analisadas (óleo de girassol, glucose, peptona, agitação e tempo de cultivo). Foi observado um aumento de 1,8 vezes na produção de lipase (12,7 U/mL) pela MSR quando comparado com a produção obtida pela análise de uma variável por vez (7,2 U/mL). Os valores ótimos obtidos para as variáveis pela MSR foram: óleo de girassol 1,0 %, glucose 0,8 %, peptona 0,8 %, 200 rpm e o tempo de cultivo mais adequado foi igual a 96 horas a 37,0 °C (KAUSHIK et al., 2006).

D'Annibale e colaboradores (2006) utilizaram um resíduo aquoso de oliva (efluente de coloração escura resultante da produção do óleo de oliva) como fonte de carbono para a produção de lipase por *Penicillium citrinum* NRRL 1841. A produção de lipase foi significativamente estimulada pela adição de nitrogênio, sendo a mais efetiva fonte o NH₄Cl. A adição de óleos vegetais não afetou a produção de lipase. Foi realizado após esta etapa, um planejamento fatorial, seguido de sua respectiva superfície de resposta, sendo as variáveis a concentração de NH₄Cl, concentração de extrato de levedura e o pH inicial do meio de cultivo. A máxima atividade de lipase (1230 U/L) foi atingida após 188 horas de fermentação (NH₄Cl (0,27%, m/v), extrato de levedura (0,11%, m/v) e pH inicial 6,15).

He; Tan (2006), otimizaram as condições do meio de cultivo para a produção de lipase por *Candida* sp. 99-125 por MSR e as influências mais significativas foram: óleo de soja (4,187%, m/v), farelo de soja (5,840%, m/v) e K₂HPO₄ (0,284%, m/v). A produção de lipase no meio já otimizado alcançou 5000 U/mL em frascos de 250 mL e 9600 U/mL em fermentador de 5 litros.

Foram selecionados para a produção de lipase por *Rhizopus chinensis* quatro variáveis que influenciaram a produção da enzima (inóculo, óleo de

oliva, volume da fermentação e peptona) e os efeitos destas foram avaliados através de MSR. Os melhores parâmetros da fermentação para tornar ótima (13875 U/L) a produção da enzima lipolítica pelo fungo foram: $4,25 \times 10^8$ esporos/L, 2,367% (m/v) de óleo de oliva, 18 mL de meio de cultivo adicionados em frascos com capacidade para 250 mL e 4,06% (m/v) de peptona (TENG; XU, 2008).

Dentre os trabalhos desenvolvidos com o gênero *Botryosphaeria*, até o presente, Vasconcelos e colaboradores (2000) utilizaram um planejamento fatorial e análise por MSR para otimizar a produção de lacase por *B. rhodina* MAMB-05. Silva e colaboradores (2007) estudaram a influência de óleo de soja e Tween 80 na produção do exopolissacarídeo botriosferana para o mesmo microrganismo. Com exceção de uma patente da Novo Nordisk S/A (NOVO NORDISK A/S, 2008 (HIRAYAMA; HALKIER, 1996)), não há citações nos artigos científicos sobre a produção de lipases por fungos do gênero *Botryosphaeria*.

3.6 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS LIPASES

As lipases constituem um grupo de biocatalisadores muito importante para aplicações biotecnológicas (JAEGER; EGGERT, 2002). São utilizadas em uma variedade de segmentos, como em indústrias de alimentos (desenvolvimento de aromas e maturação de queijos), de detergentes, farmacêuticas (síntese do anti-inflamatório não-esteróide ibuprofeno, em ensaios de produção de medicamento anti-asma - LASSBio 482), agroquímicas (inseticidas e pesticidas) e oleoquímicas (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de tensoativos, produção de biodiesel) (JAEGER et al., 1994; SAXENA et al., 1999; BEVILAQUA et al., 2004; HERNÁNDEZ-MARTÍN; OTERO, 2008; RANGANATHAN et al., 2008).

O alcatrão, por exemplo, causador de problemas na manufatura de polpa e papel é constituído em grande parte por ceras e triglicerídeos podendo ser removido com o auxílio de lipases (JAEGER; REETZ, 1998) que hidrolisam até 90% dos triglicerídeos da madeira. Essas enzimas, portanto, atuam na etapa de desengomagem das fibras para remover os componentes hidrofóbicos da madeira no processo de branqueamento da polpa Kraft (NGUYEN et al., 2008).

No tratamento de efluentes a ação de lipases também encontra aplicação, pois, auxiliam na remoção de óleos presentes nas águas de restaurantes, residências, fábricas e indústrias de refinamento de óleos que acabam poluindo os solos e as águas (JAEGER; REETZ, 1998; SHARMA et al., 2001).

Entretanto, o uso de lipases em processos industriais, especialmente para biocatálise, tem sido limitado por alguns fatores peculiares da enzima como instabilidade em certas temperaturas ou na presença de solventes orgânicos, insolubilidade, dificuldade de recuperação após a catálise. Para contornar estas dificuldades, diferentes estratégias têm sido propostas, como por exemplo, o desenvolvimento de técnicas e materiais para a imobilização de enzimas, a utilização de sistemas de micelas reversas, que preservam o número de moléculas de água necessárias à manutenção de sua estrutura, ou ainda a modificação das características enzimáticas por mutagênese sítio dirigida ou por evolução dirigida (GUPTA et al., 2004).

Outra proposta viável seria a seleção de cepas microbianas selvagens, que produzissem enzimas com características especiais para serem aplicadas em processos industriais. Muitas pesquisas atualmente se destinam a baratear o custo de obtenção destas lipases, tornando-as acessíveis para produção em grande escala. Lima e colaboradores (2003) obtiveram resultados promissores quanto à atividade lipolítica (25 U/mL) de uma enzima produzida por *Penicillium aurantiogriseum* com a otimização das condições de fermentação aliada à um meio inorgânico de baixo custo.

3.6.1 As Lipases e o Biodiesel

A Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005 dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira e sanciona que 5 % (em volume) é o percentual mínimo obrigatório, de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado, ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional. O prazo para aplicação desta lei é de 8 anos, sendo que após 3 anos após a publicação desta, um percentual de 2% de biodiesel já deverá estar adicionado ao óleo diesel (BRASIL, 2008).

Parceiro do etanol na realidade dos combustíveis renováveis, o biodiesel começa a se edificar no Brasil em relação à produção e distribuição nos postos de reabastecimento. Até o final do ano passado, 750 milhões de litros foram produzidos; perto dos 840 milhões que o país deverá produzir neste ano de 2008, para atingir a cota de 2% de incorporação desse biocombustível, ao diesel mineral derivado do petróleo (conforme a lei 11.097/05).

Não faltam em todo o mundo, alternativas de plantas para produzir óleos vegetais, principalmente na faixa tropical do planeta. Entretanto, mesmo em áreas gélidas como a região da Patagônia, já existem iniciativas para produção de biodiesel com óleo de algas marinhas. Outra experiência para a produção desse biocombustível utilizando o mesmo processo de transesterificação (Figura 3.12) é o uso de gordura de peixes (sardinha), bovinos, frangos e suínos (OLIVEIRA, 2007).

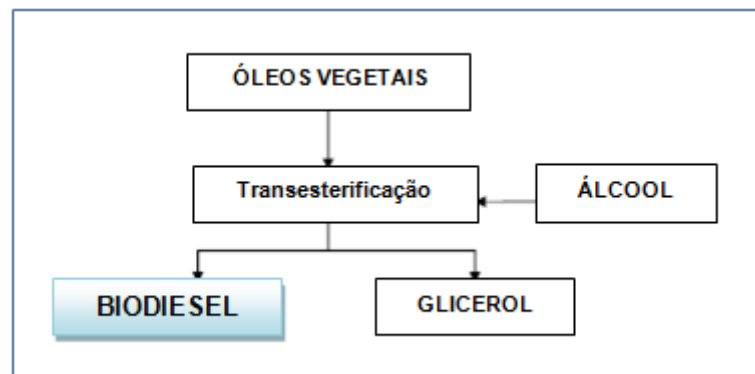


Figura 3.12 – Produção de biodiesel por transesterificação
Fonte: Ranganathan et al. (2008, com modificações)

A produção do biodiesel tem recebido considerável atenção no período atual pela condição biodegradável e não poluente deste combustível. A produção do biodiesel por transesterificação, empregando-se catálise alcalina (Figura 3.13) tem sido industrialmente aceita.

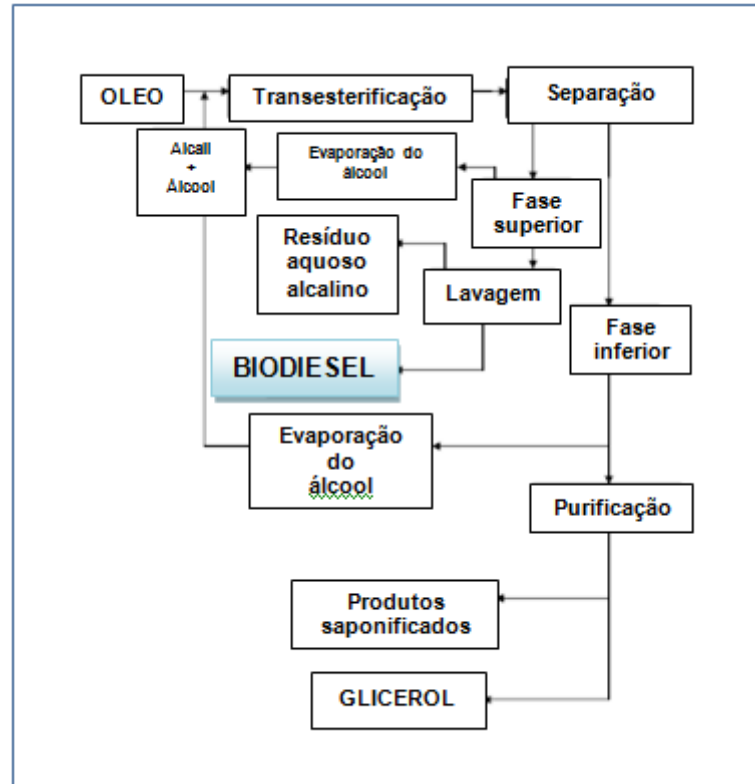


Figura 3.13 – Produção de biodiesel por processo alcalino
 Fonte: Ranganathan et al. (2008, com modificações)

Recentemente, a transesterificação enzimática também está sendo valorizada para a produção de biodiesel, pois direciona a obtenção de um produto mais purificado e permite fácil separação do subproduto glicerol (Figura 3.14). Porém, atualmente, os custos ainda são mais altos para a catálise enzimática, pois existem barreiras no processo, como a possível inibição da enzima perante o álcool e o glicerol, presentes na mistura de reação. As enzimas aptas no processo catalítico da alcoólise são as lipases e estas são obtidas principalmente de *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida Antarctica* e *Pseudomonas cepacia*. Vários tipos de álcool são utilizados nos processos de transesterificação incluindo-se metanol, etanol, isopropanol e butanol, sendo o metanol e o etanol os mais utilizados, em virtude do baixo custo e da disponibilidade (RANGANATHAN et al., 2008).

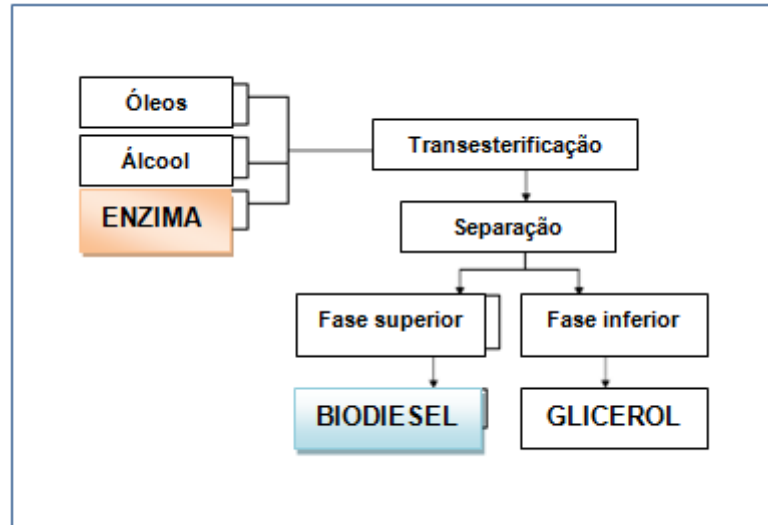


Figura 3.14 – Produção enzimática do biodiesel
 Fonte: Ranganathan et al. (2008, com modificações)

Dos trabalhos científicos publicados sobre a produção do biodiesel, normalmente há imobilização da lipase ou imobilização de células microbianas inteiras para a reação catalítica. O processo de imobilização é altamente eficiente quando comparado com o uso de lipases livres (MACEDO; MACEDO, 2004).

Noureddini; Gao; Philkana (2005) imobilizaram a lipase de *Pseudomonas cepacia* para a produção de biodiesel a partir de óleo de soja. Os alcoóis utilizados foram o metanol e etanol. Fatores como a massa da enzima, concentração de água e álcool na reação, estabilidade térmica da enzima e temperatura na transesterificação foram investigados. A reação ocorreu a 35 °C e foram utilizados 10 g de óleo de soja e 475 mg de lipase. Duas proporções molares: 1:7,5 (óleo /metanol) com adição de 0,5 g de água e 1:15,2 (óleo/etanol) com adição de 0,3 g de água, foram as condições ótimas do processo. Após 1 hora, houve formação de 67% de ésteres metílicos e etílicos.

Células imobilizadas de *Rhizopus oryzae* foram utilizadas para a produção do biodiesel por Hama e colaboradores (2007). Um reator do tipo “packed-bed” usando células inteiras do fungo (30 °C) foi desenvolvido para a produção do combustível por metanólise a partir do óleo de soja. Alta concentração do éster metílico (90 %) foi alcançada na razão de 25 L/hora no primeiro ciclo e foi mantida 80 % da metanólise até o décimo ciclo. Trabalhos recentes com o mesmo fungo foram realizados por diversos autores, seja comparando a produção do biodiesel por

lipase imobilizada ou livre, seja confrontando a eficácia de células íntegras e da lipase produzida (ambas imobilizadas) (ZENG et al., 2006; LI et al., 2007; TAMALAMPUDI et al., 2008).

Royon e colaboradores (2007) utilizaram óleo de semente de algodão para a produção de biodiesel através de lipase imobilizada de *Candida antarctica* (comercialmente disponível). Após 24 horas de reação (50 °C), obteve-se 97 % do éster formado, quando a mistura reacional para cada grama do óleo vegetal continha: 32,5% de t-butanol, 13,5% de metanol, 54% do óleo e 0,017 g de enzima. A estabilidade operacional da catálise no processo contínuo foi testada para a mesma mistura e foi alcançada uma produtividade de 4 g/h/(g da enzima) do referido éster.

Hernández-Martín; Otero (2008) estudaram a síntese enzimática do biodiesel via alcoólise para diferentes óleos vegetais (girassol, oliva, soja e borragem) e utilizaram as lipases comerciais Novozym[®] 435 (*Candida antarctica*) e Lipozyme[®] TL IM (*Thermomyces lanuginosus*). As duas lipases converteram após 48 horas (Novozym[®] 435) e 96 horas (Lipozyme[®] TL IM), 84% da reação para éster etílico. Os autores optaram pela enzima Novozym[®] 435, uma vez que após nove ciclos num reator tipo batelada (25 °C), a lipase ainda apresentava 85 % da atividade inicial.

Chen; Du; Liu (2008), observaram que a concentração da enzima, temperatura da reação, razão molar metanol/resíduo de óleo ácido e velocidade de agitação foram os fatores mais significantes na produção de biodiesel por 2 lipases (NS81006 e NS81020) do microrganismo geneticamente modificado *Aspergillus oryzae/Aspergillus niger*. A previsão da produção de biodiesel foi de 0,915 (m/m), sob as condições ideais. Experimentalmente, *a posteriori*, obteve-se $0,887 \pm 0,0161$ (m/m), confirmando a validade do modelo.

3.7 LIPASES MICROBIANAS COMO FATORES DE VIRULÊNCIA

É crescente a evidência de que as lipases extracelulares são importantes fatores de virulência microbiana (STEHR et al., 2003).

Nos estudos relacionados à microbiologia médica, desde 1953 (SHAH, D.B.; WILSON, J.B., 1965), as lipases têm sido associadas como um fator de virulência nos microrganismos. Uma reação opaca gerada na gema de ovo por uma inquestionável cepa virulenta de *Staphylococcus aureus*, denominada fator estafilocócico, foi caracterizado como uma lipase. Algumas enzimas extracelulares de *S. aureus* (coagulase, protease, hemolisina e lipase) têm sido associadas ao processo patogênico (ROLLOF et al., 1988).

Pseudomonas aeruginosa provavelmente é o patógeno produtor de lipase de maior destaque acometendo pacientes imunocomprometidos e causando infecções nos pulmões e nos ferimentos de queimadura (JAEGER et al., 1991).

As lipases fúngicas como um fator de virulência são mais negligenciadas nos artigos científicos publicados (STEHR et al., 2003). Schaller e colaboradores (2005) enfocam as enzimas hidrolíticas de *Candida albicans* como patogênicas.

Sobre os fungos fitopatogênicos, Berto e colaboradores (1999), observaram que a lipase (80 kDa) presente nos esporos de *Alternaria brassicicola* tinha uma função crucial na infecção da folhagem de couve-flor. Para comprovar a influência da enzima no processo infeccioso, anticorpos anti-lipase foram adicionados a uma suspensão de conídios de *A. brassicicola*. Os pontos pretos ocasionados pela lesão foram reduzidos em 90 % ou a couve-flor permaneceu intacta.

O modelo proposto por Voigt e colaboradores (2005) sobre o microrganismo *Fusarium graminearum*, que é um fungo causador de doenças altamente destrutivas em cereais, demonstra que a lipase produzida por ele durante a infecção no milho, pode também ser caracterizada como um fator de virulência, pois quando adicionado ao meio de cultivo um conhecido inibidor de lipase (Ebelactona B), houve uma acentuada diminuição da doença na planta, evidenciando a ação da lipase na fitopatogenicidade.

3.8 O GÊNERO *BOTRYOSPHAERIA*

O ascomiceto *Botryosphaeria* sp.(MAMB-05) é um fitopatógeno isolado de cancro de eucalipto (BARBOSA et al., 1995) que foi classificado em nível de espécie como *Botryosphaeria rhodina* (GARCIA et al., 2004). Foi primeiramente descrito como ligninolítico pelo fato de ser produtor constitutivo de lacases (BARBOSA; DEKKER; HARDY, 1996). A lacase é uma polifenol oxidase que catalisa a oxidação de vários compostos fenólicos com a concomitante redução de O₂ para H₂O (CORDI; DURÁN, 2001). Vasconcelos e colaboradores (2000) otimizaram a produção da enzima por *B. rhodina* (MAMB-05) através da influência do álcool veratrílico e tempo de cultivo.

Cunha e colaboradores (2003) caracterizaram o *B. rhodina* (MAMB-05) quanto à produção enzimática como sendo ligninolítico, pectinolítico, glucanolítico, celulolítico, hemicelulolítico, amilolítico e inulinolítico, na presença e ausência de álcool veratrílico. Posteriormente, o ascomiceto também foi relatado como produtor de um exopolissacarídeo (EPS) (DEKKER; BARBOSA, 2001) responsável pelo aumento da viscosidade do meio de cultivo (STELUTI et al., 2004), o qual foi denominado botriosferana e caracterizado como sendo uma β -(1→3; 1→6)-glucana (BARBOSA et al., 2003). O EPS produzido pelo *B. rhodina* (MAMB-05) foi utilizado no crescimento do fungo *Trichoderma harzianum* e do próprio *B. rhodina* (MAMB-05) para análise da produção de β -glucanases, usadas na produção de oligossacarídeos que podem ser utilizados como pré-bióticos (GIESE et al., 2005).

Alguns artigos científicos relatam que ácidos graxos, óleos vegetais e tensoativos podem aumentar a produção de EPS (YOUSSEF; BILIADERIS; ROUKAS, 1998). Silva e colaboradores (2007) através da MSR verificaram que o óleo de soja e Tween 80 adicionados no meio de cultivo aumentaram a produção do EPS por *B. rhodina* (MAMB-05), indicando que este seja lipolítico. Giese e colaboradores (2004) também constataram que tensoativos do tipo Tween levaram a um aumento da produção de lacase pelo *B. rhodina* (MAMB-05) e de acordo com Zhang e colaboradores (2002); as lacases estão envolvidas na degradação do triacilglicerol trilinoleína.

A utilização de óleo de soja (1,0 %, v/v) adicionado ao meio de cultivo contendo meio mínimo de Vogel (1956) aumentou a produção de biomassa ($21,88 \pm 1,11$ g/L) do *B. rhodina* (MAMB-05), em relação ao cultivo no qual foi utilizado somente glucose (1,0 %, m/v), como fonte de carbono ($6,25 \pm 0,51$ g/L), e aumentou também a produção de lacase ($1,74 \pm 0,09$ U/mL), quando comparada à produção da enzima nos cultivos que continham somente o meio mínimo ($0,36 \pm 0,15$ U/mL) (DEKKER et al., 2007). A utilização de óleos vegetais pelo gênero *Botryosphaeria* sugere que ele seja também produtor de lipases.

Saldanha e colaboradores (2007) estudaram a produção de lacase, pectinase e β -1,3-glucanase pelo *B. rhodina* (MAMB-05), *B. ribis* (EC-01) e por sete isolados de *Lasiodiplodia theobromae* (forma imperfeita de *B. rhodina*), na ausência e presença de álcool veratrílico. O melhor microrganismo produtor de lacase na presença de álcool veratrílico foi o *L. theobromae* isolado de laranja (MMLR) e na ausência o *B. rhodina* (MAMB-05). O *B. ribis* (EC-01) foi o melhor produtor de pectinase na presença do álcool veratrílico e o melhor produtor de β -1,3-glucanase na ausência deste álcool.

O gênero *Botryosphaeria* é conhecido por produzir cancrios e "dieback" (morte súbita) em diversas espécies de árvores. O *B. ribis* é um patógeno de oliveiras na Espanha, causando "dieback" nos galhos. Uma severa doença resultou na "morte súbita" dos galhos das árvores pertencentes a um pomar em Andalucia (sul da Espanha). As oliveiras afetadas apresentavam muitos ramos mortos e folhas secas ainda presas. Além do *B. ribis*, também foi isolado das cascas necrosadas um *Fusicoccum* sp. (forma anamorfa de *B. ribis*) (ROMERO; SÁNCHEZ; TRAPERO, 2005).

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* (forma imperfeita de *B. rhodina*) é conhecido na agricultura pelas doenças causadas antes da colheita e no armazenamento de frutas e tubérculos. A habilidade de colonização é reportada também quanto à produção de enzimas extracelulares (UMEZURIKE, 1969; OGUNDANA, 1971 apud ENCINAS e DANIEL, 1996). Em humanos, *L. theobromae* é causador de infecções da córnea (ceratomicose) e estas não respondem aos tratamentos com antifúngicos comuns (BORDERIE et al., 1997).

Até o presente, nenhum artigo publicado nacional ou internacionalmente descreveu a produção de lipases pelo gênero *Botryosphaeria*. Pesquisas sobre a produção, propriedades e aplicações de lipases deste gênero

fúngico, certamente irão contribuir não somente para o seu controle, como também para o desenvolvimento de novos processos biotecnológicos.

O óleo de soja produzido em abundância no Brasil é um substrato barato para a produção de lipases. Outra fonte de carbono para a produção da enzima pode ser representada pelo glicerol, visto que é um subproduto da produção do biodiesel. Portanto, o uso destas fontes de carbono pode ser uma estratégia biotecnológica viável para a obtenção de produtos com maior valor agregado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental do presente trabalho foi realizada nos laboratórios de Pesquisa do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina.

4.1 REAGENTES

Os óleos vegetais utilizados foram o de algodão (lote 0905), canola (lote 1205), girassol (lote 0406), milho (lote 120), todos da marca Salada (Bunge Alimentos S/A), enquanto que o de gergelim foi da Kenko (Sakura Nakaya Alimentos S/A, lote 19), o óleo de oliva da Andorinha (Sociedade Portuguesa de Azeites S/A, lote 011.5), o de soja da Liza (Cargil Agrícola S/A, lote 090035RV) e o de babaçu foi gentilmente doado pela Prof^a Heizir Ferreira de Castro, da Escola de Engenharia de Lorena–SP/USP.

A milhocina[®], utilizada como fonte orgânica de nitrogênio foi uma doação da CornProducts Brasil (Mogi Guaçu–SP).

O marcador de massa molecular utilizado na eletroforese (SDS-PAGE) para estimativa da massa das bandas protéicas foi o BenchMark[™] Pre-Stained Protein Ladder da Invitrogen.

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico (Aldrich, Fluka, Merck, Quimfar, Sigma ou Synth).

4.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos necessários e utilizados para a realização dos experimentos deste trabalho estão descritos abaixo:

Autoclave vertical FABBRE, modelo 103
Balanças semi-analítica GEHAKA BG-440 e analítica A&D HR-200
Banho termostatizado EVLAB
Banho-Maria fervente MARCONI TECHNICAL, modelo TE-127
Banho-Maria TECHNICAL, modelo TE-184
Câmara de fluxo laminar VECO, modelo VLFS-09
Câmara refrigerada
Centrífuga clínica FANEM, modelo EXCELSA II
Cuba para eletroforese BIOSYSTEMS
Espectrofotômetro SHIMADZU, modelo UV-1240
Estufa bacteriológica DE LEO
Estufa incubadora NOVA ÉTICA, modelo 411D
Incubador orbital CIENTEC, modelo CT-712
Micropipetas automáticas GILSON
pHmetros HANNA INSTRUMENTS (modelo HI-9321) e DIGIMED (modelo DM 20)
Titulador potenciométrico METROHM, modelo 842 Titrande (“Touch Control”)
Transluminador UVB LOCCUS BIOTECNOLOGIA, modelo LTB
Ultra-som SONICAR

A descrição do item material e métodos apresentado na seqüência, obedeceu as etapas da parte experimental desenvolvida neste trabalho, nomeadas conforme abaixo:

- 4.3 *Seleção de isolados de Botryosphaeria produtores de lipases e lacases;*
- 4.4 *Determinação dos parâmetros cinéticos e físico-químicos da lipase de Botryosphaeria ribis EC-01;*
- 4.5 *Efeito de diferentes fontes de carbono, nitrogênio, fosfato e efeito do pH inicial na produção de lipases por Botryosphaeria ribis EC-01;*
- 4.6 *Melhoramento da produção de lipases por Botryosphaeria ribis EC-01, com utilização das ferramentas estatísticas: planejamento de misturas e delineamento fatorial.*

4.3 SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *BOTRYOSPHERA* PRODUTORES DE LIPASES E LACASES

4.3.1 Meios de Cultivo

Os meios de cultivo utilizados rotineiramente no decorrer deste foram o meio BDA (Tabela 4.1), meio mínimo de sais de Vogel (1956) (Tabela 4.2) e o meio VGA (Tabela 4.3), descritos abaixo:

Tabela 4.1 – Meio de Ágar-batata dextrosado (BDA)

Batata	20 g
Dextrose	2 g
Ágar	1,5 g
Água destilada qsp	100 mL

Tabela 4.2 – Meio mínimo de sais de Vogel*

Citrato de sódio. 5 ½ H ₂ O	150 g	Solução de Elementos-traço:	
KH ₂ PO ₄ anidro	250 g	Ácido cítrico. 1 H ₂ O	5 g
NH ₄ NO ₃ anidro	100 g	ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	5 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	10 g	Fe(NH ₄) ₂ . 6 H ₂ O	1 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	5 g	CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,25 g
Solução de elementos-traço	5 mL	MnSO ₄ . 1 H ₂ O	0,05 g
Solução de biotina 0,1 mg/mL	2,5 mL	H ₃ BO ₃ anidro	0,05 g
H ₂ O destilada qsp	1000 mL	Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,05 g
		H ₂ O destilada qsp	100 mL

*O meio mínimo de Vogel descrito acima estava concentrado 50 vezes e foi diluído antes do uso. O pH final deste meio foi corrigido para 5,8 quando necessário (após a diluição)

Tabela 4.3 – Meio VGA (Vogel, glucose e Ágar)

Meio mínimo de sais de Vogel (50 vezes concentrado)	2 mL
Glucose	1 g
Ágar	2 g
Água destilada qsp	100 mL

4.3.2 Microrganismos

Neste trabalho foram avaliados os ascomicetos *Botryosphaeria ribis* EC-01 (isolado do tronco de *Eucalyptus citriodora*), *Botryosphaeria* sp. MAMB-05 (isolado de cancro de eucalipto) (BARBOSA, DEKKER, HARDY, 1996) e identificado como *B. rhodina* (GARCIA et al., 2004), além de sete outros isolados fúngicos identificados morfológicamente como *Lasiodiplodia theobromae* (forma anamorfa de *B. rhodina*). Estes últimos foram gentilmente doados pela pesquisadora Maria Menezes da Universidade Federal Rural de Recife - PE: *L. theobromae* MMGR, isolado de graviola (*Annona muricata*); *L. theobromae* MMPI, isolado de pinha (*Annona squamosa*); *L. theobromae* MMLR, isolado de laranja (*Citrus* sp.), *L. theobromae* MMMFR e MMMFO, isolados de manga (*Mangifera* sp.), fruto e folha, respectivamente, além do *L. theobromae* MMBJ isolado de uma leguminosa, a berinjela (*Solanum* sp.). O *L. theobromae* MC-01, isolado de madeira curupixá (*Micropholis* spp.) e o *Botryosphaeria ribis* EC-01 foram doados pelo Dr T.L. Krugner do Depto de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.

4.3.2.1 Manutenção dos microrganismos

Os fungos *B. rhodina* MAMB-05, *B. ribis* EC-01 e os isolados de *Lasiodiplodia theobromae* foram mantidos em BDA inclinado, à temperatura de $4,0 \pm 2$ °C e repicados trimestralmente.

4.3.2.2 Preparo do inóculo

Os ascomicetos do meio de manutenção foram repicados para placas de Petri contendo o meio VGA. As placas foram incubadas por cinco dias à 28 ± 2 °C (Figura 4.1), conforme descrito por Dekker; Barbosa (2001). Decorrido o

tempo, esferas de 0,7 cm de diâmetro, totalmente colonizadas pelo fungo, foram transferidas para os respectivos cultivos líquidos.

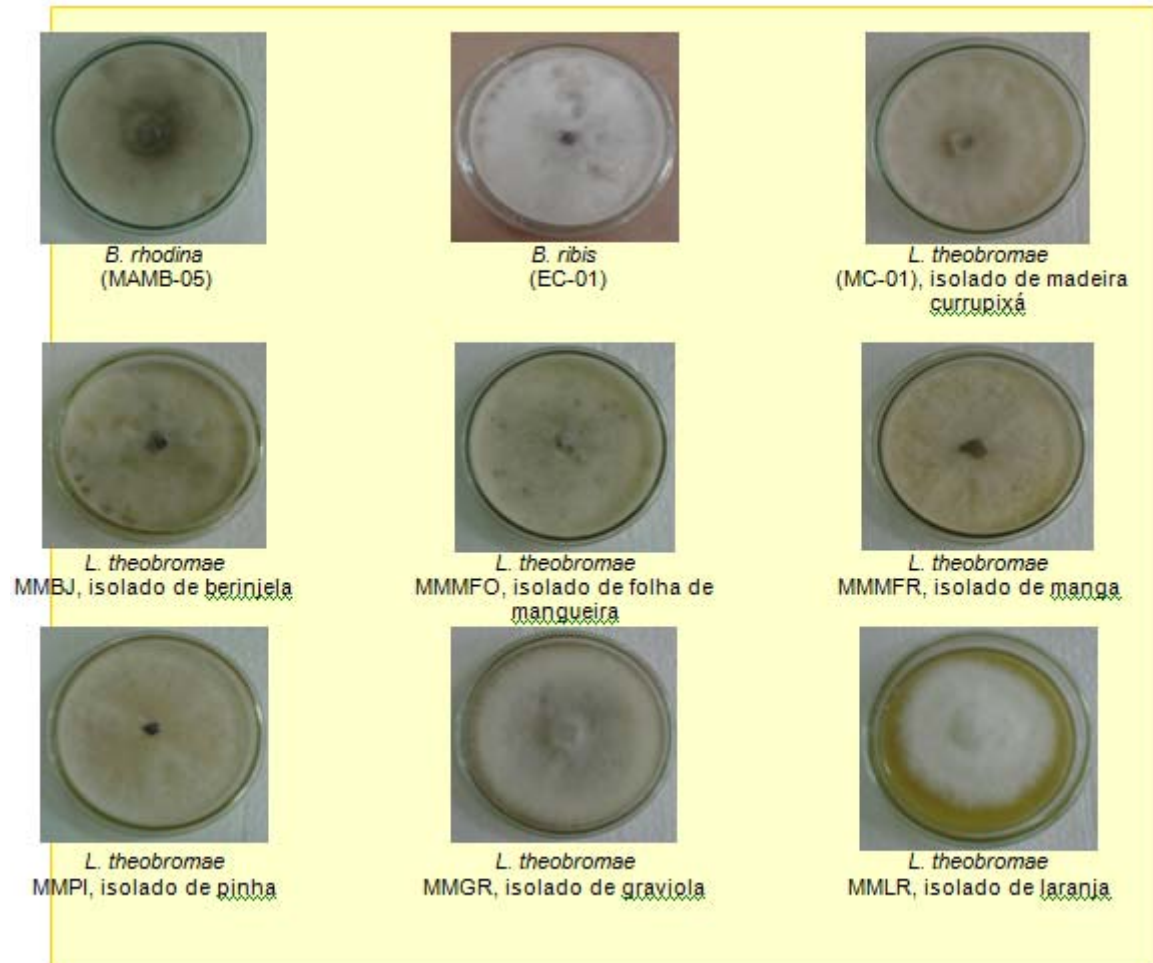


Figura 4.1 – Isolados de *Botryosphaeria* crescidos em VGA após 5 dias de cultivo a 28 °C

4.3.3 Seleção de Isolados de *Botryosphaeria* Produtores de Lipases

A seleção de isolados de *Botryosphaeria* foi realizada de duas formas: qualitativamente, através de cultivo em meio sólido com Rodamina B (em placas de Petri) e quantitativamente, em meio líquido sob fermentação submersa.

4.3.3.1 Seleção dos isolados produtores de lipase em meio sólido com Rodamina B

A seleção qualitativa de isolados de *Botryosphaeria* produtores de lipase foi desenvolvida em meio de cultivo sólido através da transferência de um disco de 0,7 cm de diâmetro, para o centro de cada placa de Petri, que continha o meio sólido com o corante Rodamina B (Tabela 4.4). Este disco estava totalmente colonizado por hifas de 5 dias de cultivo, do respectivo microrganismo teste (LIMA et al., 2004b), e foi transferido de forma invertida para manter a superfície de contato hifa-meio de cultivo. Decorridos mais cinco dias de cultivo a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, cada placa foi irradiada com luz UV a 302 nm, para visualização da presença de uma coloração alaranjada fluorescente, resultante da ação da lipase produzida pelo microrganismo avaliado, quando o teste foi positivo (vide Apêndice A).

A quantidade de fluorescência, observada subjetivamente nas placas de Petri, variou de + (presença de pontos alaranjados isolados) até +++++ (placas praticamente ocupadas pela coloração laranja), após irradiação com UV 302 nm.

Tabela 4.4 – Composição do meio de cultivo sólido para selecionar microrganismos produtores de lipase

Rodamina B	0,001 g
Óleo de soja	1,0 mL
Tween 80	0,001 g
Meio mínimo de Vogel (50 vezes concentrado)	2 mL
Ágar	1,5 g
Água destilada qsp	100 mL

Fonte: Kouker; Jaeger.(1987, com adaptações neste trabalho)

4.3.3.2 Seleção dos isolados produtores de lipase por método quantitativo em meio líquido, sob fermentação submersa

Os cultivos foram desenvolvidos em frascos de Erlenmeyer (125 mL) modificados com quatro inserções na parede, guardando-se a proporção ar:meio

(5:1), em duplicata, para cada microrganismo avaliado. Inicialmente foi utilizado o meio mínimo de Vogel e pH (5,8 a 6,0), conforme descrito por Dekker e Barbosa (2001). A fonte única de carbono do meio de cultura foi o glicerol (1,0 %, m/v) ou os óleos vegetais de soja, oliva, milho, girassol, canola, babaçu, gergelim ou algodão (1,0 %, v/v). Em cada cultivo foram inoculados quatro discos de 0,7 cm de diâmetro previamente colonizados com cada microrganismo teste. Logo após, os frascos foram incubados a 28 ± 2 °C em rotatório a 180 rpm por 5 dias.

4.3.3.2.1 Estudo da aeração do meio de cultivo

Após a escolha da melhor fonte de carbono (glicerol ou óleos vegetais) e do melhor microrganismo produtor de lipases, um novo cultivo foi realizado sob três condições diferentes de aeração:

- a) Frascos de Erlenmeyer (125 mL) modificados com 4 inserções na parede, mantidos a 180 rpm, 28 ± 2 °C, por cinco dias;
- b) Frascos de Erlenmeyer (125 mL) padrão, mantidos a 180 rpm, 28 ± 2 °C, por cinco dias;
- c) Frascos de Erlenmeyer de 125 mL, mantidos estáticos a 28 ± 2 °C, por cinco dias.

A partir deste experimento, foi utilizada nos cultivos desenvolvidos a *posteriori* a melhor condição de aeração selecionada para a produção de lipase sob fermentação submersa.

4.3.4 Seleção de Isolados de *Botryosphaeria* Produtores de Lacase em Óleos Vegetais ou Glicerol, através de Fermentação Submersa

A produção de lacase pelos nove fungos *Botryosphaeria* foi analisada conjuntamente com a produção de lipases (conforme descrito no item 4.3.3.2).

4.3.5 Interrupção dos Cultivos

Os cultivos desenvolvidos em meio líquido foram interrompidos à temperatura ambiente, através de centrifugação por 15 minutos a 1509xg.

Os sobrenadantes foram filtrados em lã de vidro, transferidos para tubos em banho de gelo e posteriormente utilizados para as determinações analíticas, incluindo-se a determinação do pH final do cultivo.

A biomassa fúngica resultante do crescimento nas diferentes condições de cultivo avaliadas foi lavada uma vez com água destilada, para remoção do óleo residual e quantificada gravimetricamente a 70 °C.

A Figura 4.2, abaixo, mostra um esquema que resume a produção de lipases e lacases através da fermentação submersa.

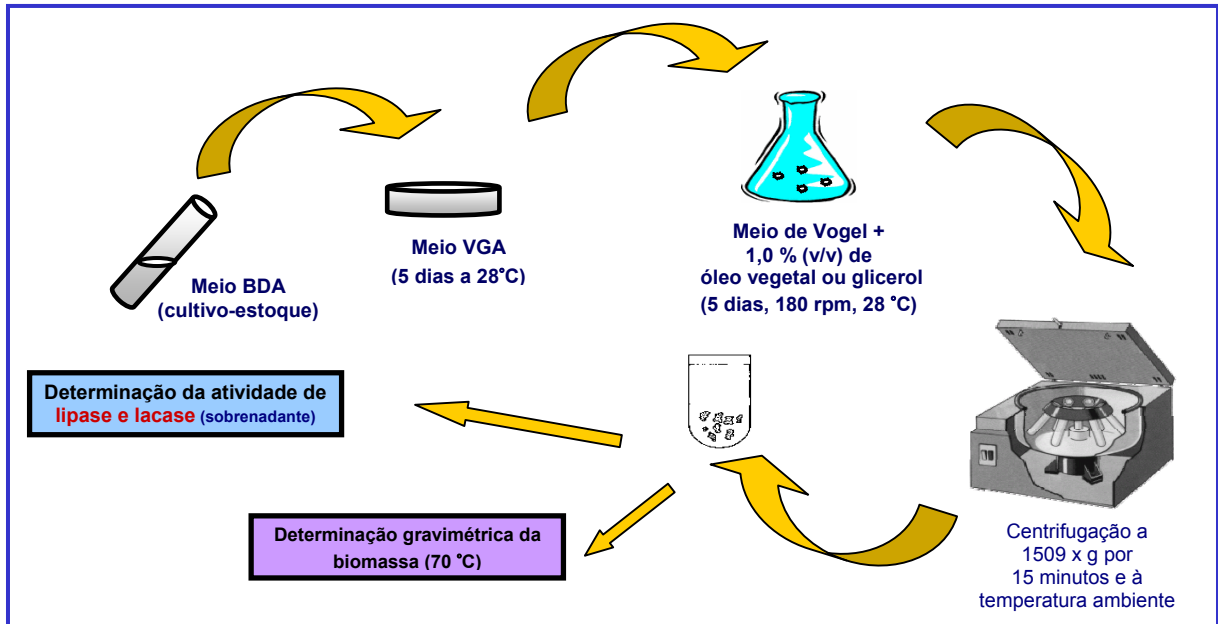


Figura 4.2 – Esquema geral para a obtenção do sobrenadante de cultivo utilizado nas determinações de atividade de lipase e lacase

4.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS E FÍSICO-QUÍMICOS DA LIPASE DE *BOTRYOSPHAERIA RIBIS* EC-01

4.4.1 Determinação do pH e Temperatura Ótimos da Lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01

Para determinar o pH e a temperatura ótimos da atividade da lipase de *B. ribis* EC-01, o filtrado do sobrenadante foi incubado com diferentes tampões na concentração de 0,05 mol/L: KCl/HCl (pH 1,0-2,0), Citrato-fosfato (pH 3,0-7,0), Fosfato de sódio (pH 6,0 – 8,0), Tris/HCl (pH 8,0-9,0) e Glicina-NaOH (pH 9-10) a 30 °C e temperaturas na faixa de 30 a 65 °C, no pH ótimo pré-determinado (vide Apêndices B e C).

Até a obtenção dos valores ótimos de pH e temperatura, o tampão utilizado na reação padrão de ensaio da atividade de lipase foi o fosfato de sódio 0,05 mol/L (pH 8,0) na temperatura de 30 °C.

4.4.2 Perfil da Atividade de Lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 Obtidas em Diferentes Condições de Cultivo

O perfil de atividade das lipases foi determinado utilizando-se substratos sintéticos como ésteres de *p*-nitrofenol (acetato, butirato, caproato, caprato, palmitato e estearato), diferentes triacilgliceróis (tributirina, tricaprilina e trioleína) (LIMA et al., 2004 a e b) e óleo de soja comercial (vide Apêndices D e E), conforme a metodologia descrita no item 4.7.2.1.

4.4.3 Ensaio de Estabilidade da Atividade da Lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01

4.4.3.1 Estabilidade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em diferentes temperaturas e valores de pH

A solução de lipase (SL) (1,0 mL) foi incubada em temperaturas de 30 ° a 85 °C, em intervalos de tempo entre 5 min e 3 horas para cada temperatura. Para as temperaturas entre 30 e 55 °C considerou-se um intervalo de 24 horas. Em determinados intervalos de tempo, alíquotas foram removidas e ensaiadas na condição padrão.

Para avaliar a influência do pH na estabilidade da enzima, o sobrenadante foi incubado durante 1 hora à temperatura ambiente, na proporção 1:1 com os diferentes tampões descritos no item 3.4.1 e também na mesma proporção com água destilada. Em seguida, a enzima foi ensaiada na reação padrão (vide Apêndice F).

4.4.3.2 Efeito de íons e detergentes na atividade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01

A solução de lipase foi incubada com diferentes sais na proporção 1:1, sendo a concentração final dos cátions (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , Na^+ , Ba^{2+} , Ag^+ , Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+}) igual a 1, 5, 10, 25, 50 e 100 mmol/L. Também foi incubada na mesma proporção com Tween 80, SDS (dodecil sulfato de sódio) e Triton X-100 (0,01 %, m/v) (LIMA et al., 2004a). A incubação à temperatura ambiente foi desenvolvida por 1 hora e em seguida a enzima foi ensaiada na condição padrão.

4.4.3.3 Efeito de solventes orgânicos na atividade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01

A estabilidade da lipase em solventes orgânicos foi avaliada através da incubação da solução da enzima por 1 hora em acetona, butanol, isopropanol, hexano, isooctano, e tolueno (99,3 %, v/v), em glicerol (50,0%, v/v) e em etanol e metanol (0,25 a 99,3 %, v/v) (SZTAJER et al., 1992; LIMA et al., 2004b). Para os solventes imiscíveis foi necessário esperar a sua total evaporação à temperatura ambiente (30 °C) para a determinação da atividade residual da lipase.

4.4.4 Avaliação do Perfil Eletroforético em Gel de Poliacrilamida Revelada para Proteína e Atividade Enzimática (Zimograma)

As eletroforeses em géis de poliacrilamida contendo SDS foram desenvolvidas de acordo com Laemmli (1970). A solução de lipase foi dialisada contra água deionizada e diluída em tampão de amostra 3 vezes concentrado (0,2 g de SDS, 1,5 mL de glicerol, 0,25 mL de 2-mercaptoetanol, 0,4 mg de azul de bromofenol e 1,0 mL de água). Em seguida foram aplicados volumes

correspondentes de 1,0 a 2,0 µg de proteína. Os géis foram preparados com 12,0% (m/v) de poliacrilamida. A corrida eletroforética foi realizada a 100 V, e 50 mA.

Antes da coloração para proteínas foi desenvolvido o procedimento para revelar a atividade enzimática segundo o método de Diaz e colaboradores, (1999) e de Prim e colaboradores, (2003). Após a corrida, o gel foi lavado por 30 minutos com uma solução a 2,5 % (m/v) de Triton X-100 para remoção do SDS e renaturação da enzima. Em seguida, o gel foi novamente lavado com tampão fosfato 0,05 mol/L, pH 8,0 e imerso em solução de butirato de metilumbeliferila (MUF-butirato) como substrato. A solução de MUF-butirato foi preparada previamente adicionando-se 2,46 mg do éster em 1,0 mL de etilenoglicol monometiléter (LIMA et al., 2004b). Após sua completa solubilização, este foi adicionado em 100 mL de tampão fosfato 0,05 mol/L, pH 8,0. As bandas com atividade enzimática estavam visíveis após iluminação com luz UV a 302 nm, mostrando um azul claro fluorescente. Neste caso, as amostras com atividade de lipase aplicadas não foram previamente desnaturadas por aquecimento a 100 °C.

Um outro gel, feito paralelamente ao mesmo tempo, na mesma cuba eletroforética foi corado com nitrato de prata segundo o método descrito por Blum e colaboradores (1987) para revelar as bandas proteicas. A única diferença com as amostras reveladas para atividade foi que as amostras aplicadas sofreram desnaturação através de aquecimento a 100 °C por 5 minutos antes da corrida eletroforética. Foi utilizado como marcador de massa molecular o BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder da Invitrogen (10 bandas proteicas compreendidas entre 6,0 e 181,8 kDa) (vide Apêndice G).

4.5 EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO, NITROGÊNIO, FOSFATO E EFEITO DO PH INICIAL NA PRODUÇÃO DE LIPASES POR *BOTRYOSPHERIA RIBIS* EC-01

Em todos os cultivos realizados, o micélio foi removido por centrifugação e os filtrados dos sobrenadantes foram analisados quanto à atividade de lipase e quantidade de proteínas totais solúveis. Quando a fonte de carbono dos cultivos foi substituída por carboidratos, estes foram também determinados nos cultivos controle (meio sem inoculação do microrganismo) e nos filtrados dos

sobrenadantes (açúcares totais residuais). Quando a fonte de nitrogênio avaliada foi orgânica, além da dosagem de açúcares totais foram também determinados os redutores.

4.5.1 Efeito da Fonte de Carbono na Produção de Lipase

Os cultivos foram realizados nas condições descritas no item 4.3.3.2.1, com alteração da fonte de carbono e em alguns casos, com alteração de sua concentração (v/v ou m/v). As fontes avaliadas estão descritas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Fontes de carbono adicionadas no meio de cultivo

Fontes de carbono	Concentração % (m/v ou v/v*)
Tween 20, 40, 60 ou 80	1,0
Tween 80	0,1
Triton X-100	1,0
Triton X-100	0,1
Ác. Esteárico + Triton X-100	1,0 + 0,1
Ác. Palmítico + Triton X-100	1,0 + 0,1
Ác. Oleico, Linoleico, ou Linolenico	1,0
Tributirina, Tricaprilina ou Trioleína	1,0
Óleo de mamona*	1,0
Óleo de soja*	0,50
Óleo de soja* - pH inicial 8,5	0,50
Óleo de soja* + Tween 80	1,0 + 0,1
Óleo de soja* + Tween 80 - pH inicial 8,5	1,0 + 0,1
Óleo de soja* + Triton X-100	1,0 + 0,1
Óleo de Soja* + Triton X-100 - pH inicial 8,5	1,0 + 0,1
Glicerol	1,0; 2,0; 4,0 e 6,0
Glucose, Frutose, Lactose, Sacarose P.A. ou Sacarose comercial	1,0

4.5.2 Efeito da Fonte de Nitrogênio na Produção de Lipase

Os cultivos foram realizados nas condições descritas no item 4.3.3.2.1, substituindo-se a fonte de nitrogênio (NH_4NO_3 , (0,2%, m/v)) do meio de Vogel (1956) pelos sais inorgânicos NaNO_3 , NH_4Cl (0,4%, m/v) ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,2%, m/v) ou por fontes orgânicas como uréia, peptona, extrato de levedura e milhocina[®] (0,2%, m/v).

4.5.2.1 Preparo da milhocina[®] para sua utilização no meio de cultivo

A milhocina[®] utilizada estava na forma de suspensão, o que dificultava a reprodutibilidade de sua concentração quando adicionada ao meio de cultivo. Os grânulos presentes na suspensão nem sempre eram aproveitados pelos microrganismos, visto que não solubilizavam. Portanto, uma alíquota de 37,5 g de milhocina[®] foi filtrada à vácuo. O filtrado foi centrifugado a 4.300 rpm, à temperatura ambiente por 15 minutos. O sobrenadante (livre de precipitado) foi pesado e 13 g foram utilizados para preparar uma solução estoque a 20,0 % (m/v) em água destilada, a qual foi mantida congelada. Todos os testes realizados com esta fonte de nitrogênio foram provenientes desta solução estoque.

4.5.3 Efeito da Fonte de Fosfato na Produção de Lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01

Os cultivos foram realizados em triplicatas nas condições descritas no item 4.3.3.2.1, substituindo-se a fonte de fosfato KH_2PO_4 (0,5%, m/v) do meio de Vogel (1956) por K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

Após este experimento, as melhores fontes de fosfato foram também avaliadas em duplicatas através de uma curva de crescimento desenvolvida até 120 horas, com interrupção dos cultivos a cada 24 horas.

4.5.3.1 Efeito do pH inicial de cultivo na produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01

O pH inicial do meio de cultivo foi ajustado dentro do intervalo de 1,0 a 10,0 utilizando-se HCl 1,0 mol/L ou NaOH 1,0 mol/L. Os experimentos foram realizados em duplicatas (vide Apêndice H).

4.6 MELHORAMENTO DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR *BOTRYOSPHAERIA RIBIS* EC-01 COM UTILIZAÇÃO DAS FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS: PLANEJAMENTO DE MISTURAS E DELINEAMENTO FATORIAL

Depois de selecionadas as variáveis mais importantes, os parâmetros para o melhoramento da produção de lipases foram estudados através de planejamentos estatísticos.

Em virtude das várias fontes de carbono estudadas e como muito pouco se sabe sobre a produção de lipases pelo gênero *Botryosphaeria*, primeiramente ficou estabelecido que pelo menos duas fontes de carbono deveriam ser misturadas em diferentes proporções para avaliação da influência de ambas na produção de lipases.

O uso de óleos vegetais (principalmente o óleo de soja) para a produção de lipases constitui uma produção de baixo custo, assim como o uso do glicerol, subproduto da produção do biodiesel. Portanto, optou-se pela utilização de glicerol (grau analítico) e do óleo de soja comercial para representar as misturas.

Para uma mistura binária (isto é, uma mistura formada por apenas dois componentes, tem-se:

$$x_1 + x_2 = 1$$

(Equação 4.1)

No estudo de misturas, o espaço experimental torna-se unidimensional. O modelo mais simples para uma mistura de dois componentes é o modelo aditivo ou linear:

$$\gamma_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \varepsilon_i, \quad (\text{Equação 4.2})$$

onde γ_i é um valor experimental da resposta de interesse, β_0 , β_1 e β_2 são os parâmetros do modelo e ε_i , representa o erro aleatório associado à determinação do valor de γ_i .

Ajustando o modelo,

$$\gamma = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2,$$

fica permitido estimar a resposta média num ponto qualquer de composição (x_1, x_2) ,

$$\hat{\gamma} = b_0(x_1 + x_2) + b_1 x_1 + b_2 x_2, \quad (\text{Equação 4.4})$$



$$\hat{\gamma} = b_1^* x_1 + b_2^* x_2, \quad (\text{Equação 4.5})$$

Quando $(x_1, x_2) = (1,0)$, isto é, quando a mistura contém apenas o componente 1 (por exemplo: o glicerol), a equação acima fica reduzida a $\hat{\gamma} = b_1^*$. Da mesma forma, quando $(x_1, x_2) = (0,1)$, a mistura contém apenas o componente 2 (por exemplo: o óleo de soja), a equação se reduz a $\hat{\gamma} = b_2^*$. Assim, os dois coeficientes do modelo aditivo são as próprias respostas dos respectivos componentes puros.

O modelo quadrático (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007) além de incluir os termos do modelo linear, contém um termo que descreve a interação dos dois componentes, ou seja,

$$\hat{\gamma} = b_1^* x_1 + b_2^* x_2 + b_{12}^* x_1 x_2, \quad (\text{Equação 4.6})$$

As fontes de carbono, glicerol (x_1) e óleo de soja (x_2) foram, portanto, misturadas conforme denota a Tabela 4.6. Para cada uma das cinco Condições de misturas (A, B, C, D e E), foi utilizado um delineamento fatorial fracionário para cinco variáveis em dois níveis (2^{5-1}), sendo a quinta variável X_5^{**} (velocidade de rotação) igual a interação de $X_1X_2X_3X_4$. Foi adicionado ao delineamento três pontos centrais^a e também dois pontos com variação de nível somente para o pH inicial^b, totalizando 21 experimentos (Tabela 4.7).

A significância dos efeitos das variáveis pH inicial do meio de cultivo (X_1), tempo de cultivo (X_2), concentração da fonte de nitrogênio (NH_4NO_3) (X_3), concentração da fonte de fosfato (KH_2PO_4) (X_4) e aeração do meio de cultivo (rotatório – rpm) (X_5) (Tabela 4.8), na produção de lipases pelo *Botryosphaeria* selecionado, foi avaliada através de fermentação submersa.

Tabela 4.6 – Misturas das fontes de carbono

Fontes de carbono	Condição A ($x_1;x_2$) = (1;0)	Condição B ($x_1;x_2$) = (0,75;0,25)	Condição C ($x_1;x_2$) = (0,50;0,50)	Condição D ($x_1;x_2$) = (0,25;0,75)	Condição E ($x_1;x_2$) = (0;1)
x_1 - Glicerol % (m/v)	6,0	4,5	3,0	1,5	0
x_2 - Óleo de Soja % (v/v)	0	0,5	1,0	1,5	2,0

Tabela 4.7 – Delineamento fatorial fracionário (2^{5-1}) realizado para cada uma das misturas (A, B, C, D, E) das fontes de carbono utilizadas

Variáveis Nº do Experimento	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
	1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1	+1
5	-1	-1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	+1
8	+1	+1	+1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1
17 ^a	0	0	0	0	0
18 ^a	0	0	0	0	0
19 ^a	0	0	0	0	0
20 ^b	-1	0	0	0	0
21 ^b	+1	0	0	0	0

Das quatro respostas observadas para cada um dos 21 experimentos pertencentes a cada mistura (pH final, atividade de lipase (U/mL), atividade específica de lipase (U/mg) e biomassa fúngica (g/L)) (vide Apêndice I), considerou-se para a seqüência da análise fatorial somente a atividade específica de lipase.

Tabela 4.8 – Fatores utilizados em cada planejamento fatorial fracionário (2^{5-1}) e seus valores reais

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
X_1^{**} pH inicial	4,5	6,5	8,5
X_2^{**} Tempo de cultivo (horas)	72	96	120
X_3^{**} Fonte de nitrogênio (% m/v) - NH_4NO_3	0,2	0,3	0,4
X_4^{**} Fonte de fosfato (% m/v) - KH_2PO_4	0,5	0,75	1,0
X_5^{**} Velocidade de rotação (rpm)	120	180	240

Diagramas de Pareto foram utilizados para facilitar a visualização dos efeitos principais das variáveis e das suas interações significativas no planejamento fracionário (2^{5-1}) realizado para cada Condição de mistura (A, B, C, D e E) (vide Apêndice J).

No intuito de saber qual seria uma mistura adequada de glicerol e óleo de soja para a produção de lipase por *B. ribis* EC-01, utilizou-se a equação 4.6 ($\hat{y} = b_1^* x_1 + b_2^* x_2 + b_{12}^* x_1 x_2$), (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007) onde b_1^* = melhor resposta do componente puro glicerol (maior produção de lipase (U/mg) (Condição A: $(x_1, x_2) = (1, 0)$), b_2^* = melhor resposta do componente puro óleo de soja (maior produção de lipase (U/mg) (Condição E: $(x_1, x_2) = (0, 1)$); x_1 e x_2 representando os novos valores de concentração de glicerol e óleo de soja e \hat{y} = valor previsto da atividade de lipase (U/mg) para a nova mistura.

Escolhida, portanto, a nova mistura das fontes de carbono acima citadas (Condição F), os mesmos fatores (pH inicial, tempo de cultivo, concentração da fonte de nitrogênio, concentração da fonte de fosfato e velocidade de rotação) foram novamente avaliados através de um delineamento fatorial completo, para cinco variáveis em dois níveis (2^5) (vide Apêndice K). Foram adicionados ao delineamento três pontos centrais e também dez pontos axiais, totalizando 45 experimentos (Tabela 4.9).

Tabela 4.9 – Planejamento Fatorial (2^5) Composto Central para a nova mistura (Condição F) das fontes de carbono glicerol e óleo de soja

Variáveis NºXdo Experimento	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
	1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	-1
7	-1	+1	+1	-1	-1
8	+1	+1	+1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	-1
11	-1	+1	-1	+1	-1
12	+1	+1	-1	+1	-1
13	-1	-1	+1	+1	-1
14	+1	-1	+1	+1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1	-1
17	-1	-1	-1	-1	+1
18	+1	-1	-1	-1	+1
19	-1	+1	-1	-1	+1
20	+1	+1	-1	-1	+1
21	-1	-1	+1	-1	+1
22	+1	-1	+1	-1	+1
23	-1	+1	+1	-1	+1
24	+1	+1	+1	-1	+1
25	-1	-1	-1	+1	+1
26	+1	-1	-1	+1	+1
27	-1	+1	-1	+1	+1
28	+1	+1	-1	+1	+1
29	-1	-1	+1	+1	+1
30	+1	-1	+1	+1	+1
31	-1	+1	+1	+1	+1
32	+1	+1	+1	+1	+1
33 ^a	0	0	0	0	0
34 ^a	0	0	0	0	0
35 ^a	0	0	0	0	0
36 ^b	-2,24	0	0	0	0
37 ^b	+2,24	0	0	0	0
38 ^b	0	-2,24	0	0	0
39 ^b	0	+2,24	0	0	0
40 ^b	0	0	-2,24	0	0
41 ^b	0	0	+2,24	0	0
42 ^b	0	0	0	-2,24	0
43 ^b	0	0	0	+2,24	0
44 ^b	0	0	0	0	-2,24
45 ^b	0	0	0	0	+2,24

Fatores	Valores reais				
	-2,24	-1	0	+1	+2,24
X_1 pH inicial	2,028	4,5	6,5	8,5	10,97
X_2 Tempo de cultivo (horas)	42,34	72	96	120	149,67
X_3 [] NH_4NO_3 (% m/v)	0,076	0,2	0,3	0,4	0,52
X_4 [] KH_2PO_4 (% m/v)	0,191	0,5	0,75	1,0	1,31
X_5 Rotação (rpm)	45,84	120	180	240	314,16

^a Ponto Central

^b Pontos Axiais

Todos os testes estatísticos foram realizados pelo programa STATISTICA ((Versão 5.1 – StatSoft Inc.), (análises de variância (ANOVA) e de

regressão)) ou pelo programa fatorial desenvolvido por Barros Neto; Scarminio; Bruns (1995) e Bruns, Scarminio, Barros Neto (2008).

4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.7.1 Determinações Analíticas

A concentração de proteínas extracelulares foi determinada através do método de Lowry (1951) de acordo com Hartree (1972). Consiste na formação de um complexo entre a proteína e o reativo cupro-alcálico seguida da redução de sais de fosfomolibdato e fosfotungstato do reativo de Folin Ciocalteu pela tirosina presente nas moléculas de proteína. Utilizou-se albumina bovina (0,1 mg/mL) como padrão. A leitura das amostras foi efetuada a 650 nm.

Os açúcares totais foram determinados pelo método do fenol-sulfúrico, descrito por Dubois e colaboradores (1956). O ácido sulfúrico concentrado desidrata pentoses e hexoses convertendo-os em furfural e hidroximetilfurfural respectivamente, os quais reagem com o fenol, formando um complexo colorido alaranjado. O complexo formado com pentoses absorve com maior intensidade na região de 480 nm, enquanto com hexoses em 490 nm.

Os açúcares redutores foram determinados segundo o método de Somogyi (1945) e Nelson (1944). A glicose reduz o reativo cuproalcalino de Somogyi, dando óxido cuproso. Na presença do reativo de Nelson ocorre a formação de um complexo de óxido de molibdênio de cor azul estável. A leitura da reação foi feita a 540 nm.

O padrão utilizado, tanto para dosagem de açúcar redutor quanto açúcar total, foi a glucose na concentração de 100 µg/mL.

4.7.2 Determinações Enzimáticas

Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizada a fórmula geral:

$$U/mL = [Abs/\epsilon \times 1/V_E \times 1/t_R \times DF \times 1000],$$

onde:

U/mL é a unidade de atividade enzimática, definida de acordo com o método utilizado, nas condições padrão de ensaio;

Abs é a absorvância a λ (nm);

ϵ é o coeficiente de extinção molar ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$);

V_E é o volume de enzima utilizado no ensaio (mL);

t_R é o tempo de reação (minutos);

DF é o fator de diluição e

1000 é o fator de conversão de M para $\mu mol/mL$.

4.7.2.1 Determinação da atividade de lipase

A atividade de lipase foi determinada pelo método espectrofotométrico, utilizando-se como substrato o palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP), inicialmente em pH 8, 30 °C, por 1 min. Este método espectrofotométrico foi inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979), tendo sido modificado por Lima et al. (2004a). Baseia-se na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) segundo o esquema da Figura 4.3, em meio aquoso, contendo o Triton X-100 como surfactante.

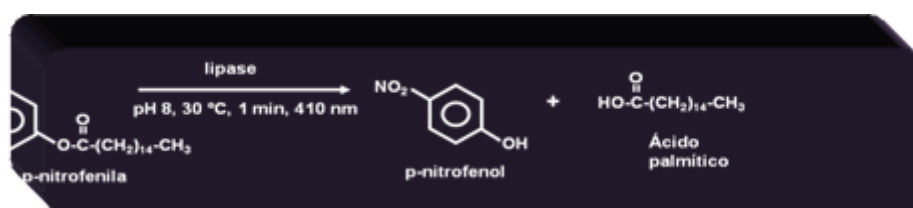


Figura 4.3 – Reação de hidrólise do *p*NPP pela lipase

A liberação do *p*-nitrofenol pela ação da lipase é quantificada através da absorvância da coloração amarela no comprimento de onda de 410 nm, em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 μmol de *p*NP (*p*-nitrofenol) liberado por minuto da solução da enzima. O coeficiente de extinção molar do *p*NP ($\epsilon = 1,5 \times 10^4 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) foi utilizado para correlacionar a concentração do produto com a absorvância obtida na leitura.

Ensaio de atividade também foram realizados com outros ésteres de *p*NP (acetato, butirato, caproato, caprato e estearato).

Procedimento técnico dos métodos utilizados para a determinação da atividade de lipase:

Soluções utilizadas no ensaio espectrofotométrico:

Solução A: palmitato de *p*-nitrofenila (ou outros ésteres de *p*-nitrofenila) em isopropanol, em uma concentração de 3,0 mg/mL.

Solução B: 2 g de Triton X-100 dissolvidos em 450 mL de tampão fosfato 0,05 mol/L, pH 8,0.

Foi adicionado lentamente, sob agitação contínua, 1 mL da solução A em 10 mL da solução B. A mistura reativa foi produzida, à fresco, imediatamente à determinação da atividade, considerando-se que o substrato é instável em meio aquoso. Estando o banho-Maria na temperatura ótima, ou seja, 55 °C, para a atividade da lipase, 0,9 mL da mistura foi adicionado em tubo de ensaio. Em seguida, 0,1 mL do extrato enzimático também foi adicionado. Decorrido o tempo da reação, a leitura da atividade foi efetuada a 410 nm.

A atividade de lipase foi também determinada pelo método titulométrico utilizando-se como substrato triacilgliceróis. Uma emulsão contendo 7,0 % de triacilglicerol (tributirina, tricaprilina, ou trioleína) ou óleo de soja comercial e 4,5 % de Triton X-100 em tampão fosfato 0,05 mol/L, pH 8,0 foi incubada com 0,5 mL de enzima e titulada com NaOH 0,05 mol/L, utilizando-se um titulador potencimétrico (Metrohm, modelo 842, série Titrand) do tipo pH STAT, por 5

minutos, na temperatura ótima da atividade da lipase, ou seja, 55 °C. A unidade de atividade de lipase definida por esta técnica corresponde a 1 μmol de ácido graxo liberado por minuto da solução de enzima. Esta metodologia foi desenvolvida de acordo com STUER e colaboradores (1986).

4.7.2.2 Determinação da atividade de lacase

A atividade de lacase presente no extrato livre de células (filtrado do sobrenadante do cultivo) foi determinada conforme descrito por Barbosa; Dekker; Hardy (1996), utilizando-se como substrato o ABTS (2,2 azino-bis ácido (3- etilbenzotiazolina-6-sulfônico). O sistema de incubação consistiu de 50 μL de ABTS, 150 μL de tampão McIlvaine (pH 3,0), 100 μL de solução enzimática (diluída quando necessário) e 700 μL de água deionizada para completar o volume final da reação (1,0 mL). Depois de cinco minutos de incubação a 50°C, a leitura foi determinada no comprimento de onda de 420 nm. Uma unidade de atividade de lacase foi expressa como o número de μmols de substrato oxidado por minuto, por mL da solução de enzima.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fungos decompositores de madeira, principalmente basidiomicetos têm sido descritos como os melhores produtores de lacases, entretanto, ascomicetos são também produtores destas polifenol oxidases (DEKKER et al., 2007). As lacases são enzimas envolvidas na degradação da lignina e também consideradas um dos fatores de virulência fúngica (VASCONCELOS, 2001).

Alguns membros da família *Botryosphaeriaceae* têm sido descritos como os patógenos mais agressivos da comunidade fúngica endofítica, e muitas vezes, matam uma grande parte de seu hospedeiro (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007), representado principalmente por espécies de *Eucalyptus* e *Acacia* (MOHALI, SLIPPERS; WINGFIELD, 2006).

5.1 SELEÇÃO DOS ISOLADOS DE *BOTRYOSPHAERIA* PRODUTORES DE LACASES ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Neste trabalho foram avaliados nove ascomicetos pertencentes ao gênero *Botryosphaeria* (item 4.3.2) quanto à produção de lipases (item 5.2) e lacases, depois de cultivados em diferentes óleos vegetais (soja, oliva, girassol, milho, canola, babaçu, gergelim e algodão) ou glicerol como única fonte de carbono.

O *B. rhodina* MAMB-05 foi o melhor produtor de lacase em todos os óleos, destacando-se a produção desta polifenol oxidase nos óleos de algodão (2,9 U/mL), babaçu (2,6 U/mL) e glicerol (2,5 U/mL). O segundo melhor produtor de lacase foi o *Lasiodiplodia theobromae* MMLR (forma anamorfa ou imperfeita de *B. rhodina*, isolado de laranja), cuja atividade foi 1,1 U/mL (Figura 5.1) ou 3,9 U/mg de lacase (Tabela 5.1), quando a fonte de carbono foi o óleo de gergelim (constituído principalmente pelos ácidos oléico (46,30%) e linoléico (36,10%) (HIREMATH et al., 2007)). Os demais microrganismos produziram menor atividade de lacase, ou seja, inferior a 0,7 U/mg (Tabela 5.1), nas fontes de carbono estudadas.

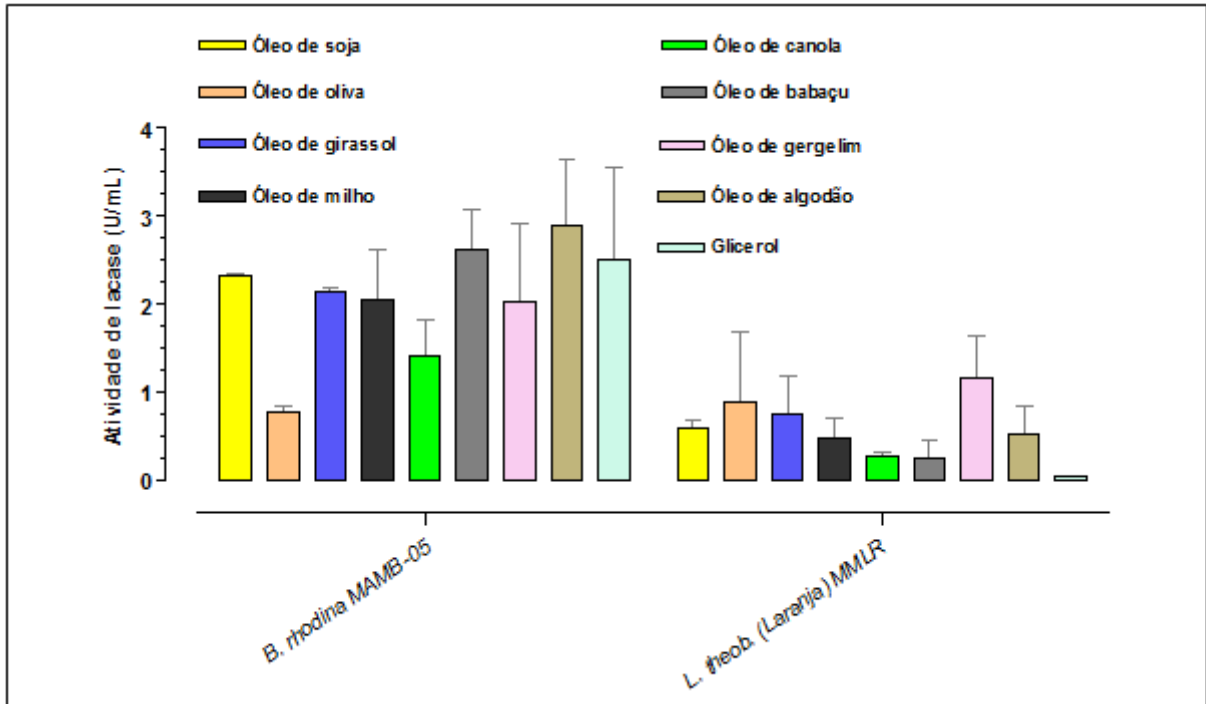


Figura 5.1 – Perfil da produção de lacase (U/mL) por *B. rhodina* MAMB-05 e *L. theobromae* MMLR (isolado de laranja) em diferentes óleos vegetais (1,0%, v/v) ou glicerol (1,0%, m/v)

Dekker e colaboradores (2007) adicionaram óleo de soja (1,0%, v/v) ao meio mínimo de Vogel (1956) para a produção de lacase pelo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, que produziu cinco vezes mais lacase (1,74 U/mL) quando comparada à produção neste mesmo meio mínimo (0,36 U/mL) contendo glucose como fonte de carbono.

A atividade específica de lacase de *B. rhodina* MAMB-05 foi maior no cultivo contendo óleo de babaçu (14,7 U/mg) (Tabela 5.1). Este óleo é constituído principalmente de ácido láurico (44,7%) (URIOSTE, 2008) que contém 12 carbonos na sua cadeia graxa e isto o diferencia dos outros óleos vegetais utilizados neste trabalho (representados principalmente por ácidos graxos insaturados com cadeia de 18 carbonos) (SAKURAI; POKORNÝ, 2003).

A produção de lacase ocorre durante o metabolismo secundário e é regulada de modo complexo pelos nutrientes existentes no meio de cultura (DEKKER et al., 2007). Zhang e colaboradores (2002) demonstraram que a lacase pode oxidar ésteres de ácidos graxos e lipídeos. Triacilgliceróis de cadeia longa são substratos naturais de lipases, todavia, são também reconhecidos pelas lacases que participam, portanto, do processo da assimilação lipídica pelo fungo.

Vasconcelos e colaboradores (2000) utilizaram 30,4 mM de álcool veratrílico (AV) no meio de cultivo para aumentar a produção de lacase por *Botryosphaeria* sp. Este álcool, quando em baixas concentrações, tem sido descrito como indutor de lacase para alguns basiodimicetos (VASCONCELOS, et al 2001) e, em concentrações elevadas induziu esta polifenol oxidase no ascomiceto *B. rhodina* MAMB-05 (Dekker et al, 2007). O glicerol a 1,0% (m/v) ou 2,72 mM (utilizado no cultivo) também foi uma fonte de carbono muito boa para o *B. rhodina* MAMB-5 visto que a atividade específica obtida foi 25,8 U/mg (Tabela 5.1).

A Tabela 5.2 mostra os valores médios da produção de biomassa (g/L) para os isolados de *Botryosphaeria* avaliados quanto à produção de lacases nos óleos vegetais ou glicerol como fontes de carbono. A biomassa micelial do *B. rhodina* MAMB-05 nos diferentes óleos vegetais ficou em torno de 10,7 g/L, porém, somente 4,2 g/L foram produzidos quando a fonte de carbono foi o glicerol, apesar da produção de lacase ter sido muito significativa. Vasconcelos e colaboradores (2000), utilizando planejamento fatorial e análise por metodologia de superfície de resposta, observaram que o álcool veratrílico quando adicionado no meio de cultivo, também comprometeu a produção de biomassa pelo *Botryosphaeria* sp., todavia, a produção da lacase aumentou acentuadamente. Portanto, não existe correlação direta entre produção de biomassa micelial e produção de lacase para este ascomiceto.

O perfil do pH final dos meios de cultivos nos diferentes óleos vegetais ou glicerol quase não variou em relação ao inicial (pH do meio mínimo de Vogel (1956)), excetuando-se os valores mais alcalinos para o *L. theobromae* MMGR (isolado de graviola) e valores mais ácidos para o *L. theobromae* MMLR (isolado de laranja) (Tabela 5.3).

Foi também determinada a atividade de lacase para uma condição de cultivo melhorada para a produção de lipase (U/mg), que consistia do meio mínimo de Vogel (1956) e 1,0 % (v/v) de óleo de soja.

Tabela 5.1 – Produção de lacase (U/mg) pelos isolados de *Botryosphaeria* em diferentes óleos vegetais ou glicerol como única fonte de carbono

Fontes de Carbono Microrganismos	Óleo de soja	Óleo de oliva	Óleo de girassol	Óleo de milho	Óleo de canola	Óleo de babaçu	Óleo de gergelim	Óleo de algodão	Glicerol
<i>B. rhodina</i> MAMB-05	5,1 ± 1,6	2,4 ± 0,1	4,4 ± 3,2	9,3 ± 2,8	6,9 ± 6,3	14,7 ± 4,7	7,7 ± 2,7	7,4 ± 1,5	25,8 ± 1,0
<i>B. ribis</i> EC-01	0,01 ± 0,0	0,02 ± 0,0	0,02 ± 0,0	0,01 ± 0,0	0,01 ± 0,0	0,02 ± 0,0	0,01 ± 0,0	0,01 ± 0,0	0,02 ± 0,0
<i>L. theob.</i> (Berinjela) MMBJ	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1
<i>L. theob.</i> (Graviola) MMGR	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,02 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,04 ± 0,0	0,02 ± 0,0	0,03 ± 0,0	0,04 ± 0,0	0,04 ± 0,0
<i>L. theob.</i> (Laranja) MMLR	2,7 ± 0,5	2,7 ± 2,5	2,6 ± 1,5	1,8 ± 0,9	1,4 ± 0,3	0,3 ± 0,1	3,9 ± 1,4	2,0 ± 1,4	0,9 ± 0,0
<i>L. theob.</i> (Madeira Curupixá) MC-01	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,7 ± 0,4
<i>L. theob.</i> (Folha da Mangueira) MMMFO	0,03 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,03 ± 0,0	0,03 ± 0,0	0,03 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,04 ± 0,0	0,02 ± 0,0	0,1 ± 0,0
<i>L. theob.</i> (Manga) MMMFR	0,1 ± 0,0	0,03 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,3	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0
<i>L. theob.</i> (Pinha) MMPI	0,1 ± 0,0	0,03 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1

Tabela 5.2 – Valores médios de Biomassa (g/L) para os nove ascomicetos testados quanto à produção de lacases nos diferentes óleos vegetais (1,0%, v/v) ou glicerol (1,0%, v/v)

Fontes de Carbono Microrganismos	Óleo de soja	Óleo de oliva	Óleo de girassol	Óleo de milho	Óleo de canola	Óleo de babaçu	Óleo de gergelim	Óleo de algodão	Glicerol
<i>B. rhodina</i> MAMB-05	11,4 ± 0,2	9,8 ± 1,4	10,8 ± 2,0	11,6 ± 0,4	11,4 ± 0,2	9,2 ± 1,6	12,0 ± 0,4	9,6 ± 2,8	4,2 ± 1,0
<i>B. ribis</i> EC-01	9,4 ± 0,2	8,7 ± 1,8	9,0 ± 0,2	8,4 ± 1,6	8,8 ± 0,8	8,8 ± 0,0	9,0 ± 0,6	10,2 ± 0,6	6,0 ± 0,0
<i>L. theob.</i> (Berinjela) MMBJ	9,7 ± 0,8	9,5 ± 0,0	8,7 ± 1,2	8,5 ± 0,2	8,1 ± 2,6	8,5 ± 0,2	9,9 ± 1,6	10,3 ± 1,2	5,1 ± 0,4
<i>L. theob.</i> (Graviola) MMGR	6,6 ± 1,2	6,6 ± 0,4	7,6 ± 0,6	7,4 ± 0,4	7,0 ± 0,4	4,0 ± 0,2	6,8 ± 1,0	7,4 ± 1,6	4,6 ± 0,0
<i>L. theob.</i> (Laranja) MMLR	5,5 ± 0,0	7,6 ± 0,0	6,0 ± 0,4	5,3 ± 2,08	6,2 ± 0,0	0,8 ± 0,3	5,1 ± 0,6	8,2 ± 1,2	1,0 ± 0,2
<i>L. theob.</i> (Madeira Currupixá) MC-01	7,3 ± 1,6	6,5 ± 3,2	7,1 ± 1,0	8,3 ± 1,4	8,3 ± 0,2	8,5 ± 0,0	7,5 ± 0,6	8,5 ± 0,4	3,7 ± 2,0
<i>L. theob.</i> (Folha da Mangueira) MMMFO	10,5 ± 0,2	10,1 ± 0,2	9,1 ± 0,8	9,3 ± 1,0	9,9 ± 1,2	11,1 ± 1,6	10,7 ± 0,0	8,8 ± 0,0	4,1 ± 2,2
<i>L. theob.</i> (Manga) MMMFR	10,3 ± 0,2	10,5 ± 2,0	8,9 ± 0,4	9,9 ± 1,4	8,9 ± 0,8	9,3 ± 0,8	9,1 ± 0,2	8,7 ± 2,2	4,7 ± 1,4
<i>L. theob.</i> (Pinha) MMPI	11,5 ± 0,8	8,9 ± 0,2	9,9 ± 0,0	10,3 ± 0,4	8,7 ± 1,2	11,7 ± 3,4	8,5 ± 0,2	8,9 ± 1,0	3,3 ± 0,6

Tabela 5.3 – Perfil do pH final dos cultivos em óleos vegetais ou glicerol como fontes de carbono

Fontes de Carbono Microrganismos	Óleo de soja	Óleo de oliva	Óleo de girassol	Óleo de milho	Óleo de canola	Óleo de babaçu	Óleo de gergelim	Óleo de algodão	Glicerol
<i>B. rhodina</i> MAMB-05	6,02±0,12	5,99±0,14	6,10±0,00	6,21±0,09	6,11±0,11	6,15±0,05	5,61±0,29	5,91±0,09	6,07±0,26
<i>B. ribis</i> EC-01	5,69±0,29	5,70±0,00	5,83±0,05	6,09±0,20	5,68±0,03	6,03±0,13	5,77±0,01	5,83±0,10	5,81±0,06
<i>L. theob.</i> (Berinjela) MMBJ	5,70±0,21	5,98±0,23	5,66±0,13	5,50±0,03	5,91±0,17	5,85±0,17	5,73±0,41	5,55±0,01	6,32±0,13
<i>L. theob.</i> (Graviola) MMGR	6,90±0,11	6,89±0,09	7,04±0,01	6,91±0,06	6,90±0,05	7,20±0,21	6,84±0,01	7,01±0,12	6,63±0,07
<i>L. theob.</i> (Laranja) MMLR	5,60±0,40	5,87±0,21	5,93±0,31	5,70±0,32	5,45±0,10	5,56±0,00	5,54±0,36	5,93±0,04	5,69±0,36
<i>L. theob.</i> (Currupixá) MC-01	5,60±0,40	5,87±0,21	5,93±0,31	5,69±0,32	5,45±0,10	5,56±0,00	5,54±0,36	5,93±0,04	5,69±0,36
<i>L. theob.</i> (F. Mang.) MMMFO	5,63±0,11	5,83±0,00	5,67±0,01	5,61±0,00	5,60±0,02	6,00±0,11	5,46±0,02	5,53±0,18	5,57±0,03
<i>L. theob.</i> (Manga) MMMFR	5,40±0,09	5,54±0,03	5,45±0,10	5,76±0,10	5,64±0,06	5,87±0,06	5,52±0,28	5,30±0,19	5,39±0,14
<i>L. theob.</i> (Pinha) MMPI	5,68±0,08	5,65±0,149	5,21±0,15	5,47±0,58	5,14±0,17	5,47±0,96	5,19±0,22	5,31±0,33	5,35±0,12

O pH inicial do meio foi acertado para 8,5 com NaOH 0,5 mol/L e o cultivo teve duração de 5 dias a 28 °C e 180 rpm. Na seleção dos nove microrganismos quanto a produção de lacases e lipases, *B. ribis* EC-01 produziu em média 0,003 U/mL (0,01 U/mg) de lacase, enquanto que a atividade de lipase foi igual a 3,9 U/mL ($23,0 \pm 5,8$ U/mg). Na condição de cultivo previamente citada, ou seja, melhorada para a produção de lipase, praticamente não houve alteração da produção da atividade de lacase (0,005 U/mL e 0,03 U/mg) quando comparada ao elevado aumento da atividade da lipase ($145,5 \pm 7,1$ U/mL e $632,2 \pm 20,5$ U/mg).

5.2 SELEÇÃO DOS ISOLADOS DE *BOTRYOSPHERIA* PRODUTORES DE LIPASES

Os resultados obtidos neste trabalho de Dissertação sobre a produção de lipases pelos ascomicetos do gênero *Botryosphaeria* estão apresentados em dois artigos, que constituem os itens 5.2.1 e 5.2.2 a seguir:

5.2.1 Artigo A

**“SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *BOTRYOSPHERA* PRODUTORAS DE
LIPASES: PRODUÇÃO DE LIPASE POR *BOTRYOSPHERA RIBIS* EC-01 EM
ÓLEO DE SOJA E OUTRAS FONTES DE CARBONO”**

**Josana M. Messias, Bruna Z. da Costa, Valéria M. G. de Lima, Robert F. H. Dekker,
Maria I. Rezende, Nadia Krieger, Aneli de M. Barbosa ***

**(REDIGIDO DE ACORDO COM AS NORMAS DO PERIÓDICO ENZYME AND
MICROBIAL TECHNOLOGY).**

SCREENING *BOTRYOSPHERAERIA* SPECIES FOR LIPASES: PRODUCTION OF LIPASE BY *BOTRYOSPHERAERIA RIBIS* EC-01 GROWN ON SOYBEAN OIL AND OTHER CARBON SOURCES

SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *BOTRYOSPHERAERIA* PRODUTORAS DE LIPASES: PRODUÇÃO DE LIPASE POR *BOTRYOSPHERAERIA RIBIS* EC-01 EM ÓLEO DE SOJA E OUTRAS FONTES DE CARBONO

Josana M. Messias¹, Bruna Z. da Costa^a, Valéria M. G. de Lima², Robert F. H. Dekker³, Maria I. Rezende^a, Nadia Krieger⁴, Aneli de M. Barbosa^{a*}

Abstract

Nine isolates of *Botryosphaeria* spp. were screened for lipases when cultivated on eight different plant seed oils and glycerol, and all produced lipases. *Botryosphaeria ribis* EC-01 produced highest lipase titres on soybean oil and glycerol, while eight isolates of *Botryosphaeria rhodina* produced significantly lower enzyme titres. *B. ribis* EC-01 produced lipase when grown on different fatty acids, surfactants, carbohydrates and triacylglycerols, with highest enzyme titres produced on Triton X-100-emulsified stearic (316.7 U/ml), palmitic (283.5 U/ml) and oleic (247.4 U/mg) acids, and soybean oil (105.6 U/ml), as well as castor oil (191.2 U/mg). Glycerol was also a good substrate for lipase production. The crude lipase extract was optimally active at pH 8.0 and 55 °C, stable between 30-55 °C and pH 1.0-10.0, and tolerant to 50 % (v/v) glycerol, methanol and ethanol. The crude lipase showed affinity for substrates of short, average and long-chain fatty acids (different esters of *p*-nitrophenol and triacylglycerols). Zymograms developed with 4-methylumbelliferyl-butyrate showed two bands of lipolytic activity at 45 and 15 kDa. This is the first report on the production of lipases by *Botryosphaeria ribis* grown on these different carbon sources.

Keywords: Lipase. *Botryosphaeria ribis* EC-01. *Botryosphaeria rhodina*. castor oil. soybean oil and glycerol; thermal and pH stability. stability in organic solvents.

¹ Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – CCE – Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-990, Londrina – PR, Brazil * Corresponding author: Dr. Aneli de Melo Barbosa. E-mail: aneli@uel.br

² Departamento de Ciências Biológicas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Assis – SP, Brazil

³ Biorefining Research Initiative, Lakehead University, Thunder Bay, Ontario, Canada P7B 5E1

⁴ Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brazil

1 INTRODUCTION

Lipases (EC 3.1.1.3) catalyse the hydrolysis and synthesis of long-chain acylglycerols with triolein regarded as being the standard substrate [1]. Lipases are currently considered key-enzymes in an exponentially-growing biotechnological market given their many biocatalytic properties [2]. The main application of these enzymes is still restricted to their use in laundry detergents for the removal of fat and oil stains [3]. They are also used in various food and agrochemical industries, e.g., processing foods, treatment of fatty effluents, synthesis of biodetergents, removal of resins in processing paper from cellulosic pulp, and in biotransformation reactions in the synthesis of drugs [4, 5]. The lipase-catalysed transesterification reaction is increasingly becoming more attractive for use in the production of biodiesel fuels [6].

Lipases are produced by many microorganisms, including bacteria, actinomycetes, fungi and yeasts. There are a considerable number of strains used in the industrial-scale production of this enzyme. The applications of lipases are frequently hampered by limited stability of the enzyme at high temperatures or in organic solvents, and this merits the selection of novel microorganisms capable of producing lipases with physicochemical properties suitable for industrial applications [4, 7, 8].

Ascomycetes of the genus *Botryosphaeria* and its anamorphic form *Lasiodiplodia theobromae* are filamentous fungi [9], and have been described as good producers of laccases and pectinases [10, 11], and the exopolysaccharide (EPS), botryosphaeran [12]. The ability of *B. rhodina* MAMB-05 to grow on soybean oil as sole carbon source confirmed its lipolytic activity [13].

Soybean oil, which is abundantly produced in Brazil, and glycerol, a by-product from the rapid-growing biodiesel industry, are potential low-cost fermentation substrates for the production of lipases. Apart from a patent [14], there are no reports in the scientific literature describing the lipases of the genus *Botryosphaeria*. In this work, we evaluated nine isolates of *Botryosphaeria* spp. for the production of lipase when these isolates were grown on eight different vegetable oils and glycerol as sole carbon sources. *Botryosphaeria ribis* strain EC-01 was found to be the best lipase producer among these fungal isolates when grown on soybean oil and glycerol. We also report on the stability displayed at different pH, temperatures and in organic solvents of the crude lipase produced by *B. ribis* EC-01 with the objective that this may aid future biotechnological applications of this enzyme.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 MATERIALS

All vegetable oils used in this study were food grade. Canola, cotton seed, maize and sunflower oils were purchased from Salada – Bunge Alimentos S/A (Brazil); sesame seed oil was from Kenko – Sakura Nakaya Alimentos S/A, olive oil from Andorinha – Sociedade Portuguesa de Azeites S/A; castor oil (mamona) from Remy Comércio e Beneficiamento de Mamona (Londrina-PR, Brazil); and soybean oil from Liza - Cargil do Brasil. Babaçu (babassu) oil, an edible oil, was extracted from babaçu palm nuts (*Attalea speciosa*, sin. *Orbignya phalerata*), a native species of the Amazonian Forest of South America. Corn steep liquor was provided by CornProducts Brazil (Mogi Guaçu, São Paulo). Triacylglycerols (tributylin, tricaprylin and triolein) and *p*-nitrophenyl esters (acetate, butyrate, caproate, caprate, palmitate and stearate) were purchased from Sigma-Aldrich (EUA). All other reagents were of analytical grade.

2.2 METHODS

2.2.1 *Botryosphaeria* Isolates

Botryosphaeria ribis EC-01 was isolated from the stem of a *Eucalyptus citriodora* tree in São Paulo (Brazil) [15]. *Botryosphaeria* sp. MAMB 05 was isolated from an eucalypt stem canker [10] and molecularly identified as *B. rhodina* [16]. Isolates from five rotting Brazilian tropical fruits, an infected mango tree leaf, and decaying wood were all morphologically identified as *Lasiodiplodia theobromae* and molecularly classified as *B. rhodina* [11]. They are represented by *B. rhodina* MMGR (from soursop (graviola), *Annona muricata*); *B. rhodina* MMPI (from sugar-apple (pinha), *Annona squamosa*); *B. rhodina* MMLR (from orange, *Citrus* sp.), *B. rhodina* MMMFR and MMMFO (respectively from mango fruit and mango tree leaf, *Mangifera* sp.), *B. rhodina* MMBJ (from eggplant (beringela), *Solanum* sp.), and *B. rhodina* MC-01 [15] (isolated from currupixá wood, *Micropholis* spp., in the Amazon region (Belém-Pará) of Brazil). All nine isolates of the *Botryosphaeria* spp. were maintained on potato-dextrose agar (PDA) slants at 4.0 ± 2 °C, and subcultured at three-monthly intervals.

2.2.2 Preparation of Inoculum and Growth Conditions

All fungal isolates were initially grown on PDA-slants and transferred to agar plates containing glucose (10 g/L), a minimum salts medium (VMSM, Vogel [17]), and agar (20 g/L), and left at 28 ± 2 °C for 5 d. Following growth, four plugs of 0.7 cm-diameter taken from the mycelial-colonised plates were used to inoculate Erlenmeyer flasks containing nutrient medium and grown in submerged liquid culture [18].

2.2.3 Zymogram Screening of Lipase-Producing *Botryosphaeria* spp. Strains

Screening for lipase production was performed by transferring one 0.7 cm-diameter agar plug colonised by *Botryosphaeria* spp. to the center of Petri dishes containing agar (15 g/L in distilled water), VMSM, soybean oil (10 mL/L), Rhodamine B (0.01 g/L, Merck) and Tween 80 (0.01 g/L) [19]. Fungal isolates were allowed to grow for 5 d at 28 ± 2 °C. Lipolytic activity was indicated by the appearance of a fluorescent orange-colored zone around the growing colonies when irradiated by UV light (302 nm). Experiments were carried out in replicates of three.

2.2.4 Quantitative Evaluation of Lipase Production by *Botryosphaeria* spp.

Cultivations were conducted in duplicate for each of the nine isolates of the *Botryosphaeria* spp. in baffled Erlenmeyer flasks (125 mL, 4 baffles/flask) containing nutrient medium comprising VMSM, and different vegetable oils (1.0 %, v/v) or glycerol (1.0 %, w/v) as sole carbon sources at pH 5.8-6.0. Vegetable oils used in this experiment were babaçu, canola, cotton seed, maize, olive, sesame, soybean or sunflower as indicated in Table 1. Each flask was inoculated with four 0.7 cm-diameter agar plugs containing fungal mycelium and kept at 28 ± 2 °C in a rotary shaker (180 rpm) for 5 d.

2.2.5 Effect of Shaking on Fungal Growth and Lipase Production by *Botryosphaeria ribis* EC-01

The effect of shaking on the production of lipase by *B. ribis* EC-01 was examined in liquid submerged cultivation on medium containing 1.0 % (v/v) soybean oil (28 ± 2 °C for 5 d). Cultures were grown in standard and baffled [18] Erlenmeyer flasks (125 mL)

under shaking conditions (180 rpm), as well as standard Erlenmeyer flasks (125 mL) left stationary. All cultivations were carried out in triplicate.

2.2.6 Effect of Different Carbon Sources on Production of Lipases by *Botryosphaeria ribis* EC-01

Cultivation of *B. ribis* EC-01 was carried out (replicates of three) following the conditions described in 2.2.4, but replacing soybean oil by the different carbon sources as outlined in Table 2.

2.2.7 Preparation of Crude Lipase Extracts (CLE) from *Botryosphaeria ribis* EC-01

Five-day old cultures of *B. ribis* EC-01 were harvested by centrifugation (1500 x g/15 min), and the supernatant recovered (CLE) was used as the source of lipase. The resulting mycelium (fungal biomass) was washed with distilled water and determined gravimetrically by drying (70 °C) to constant weight.

2.2.8 Analytical Methods

Extracellular protein was determined by Hartree [20] using bovine albumin as standard.

2.2.9 Determination of Lipase Activity

All assays for lipase activity were determined using *p*-nitrophenyl-palmitate (*p*NP-P) as the standard substrate [21]. The reaction was carried out in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) at 55 °C for 2 min. Absorbance was measured at 410 nm (coefficient of molar extinction for *p*-nitrophenol (*p*NP): $1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [19]). Titration was also used to confirm lipolytic activity. An emulsion containing 7.0 % triacylglycerol (tributyrin, tricaprylin or triolein) or commercial soybean oil, and 4.5 % Triton X-100 in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) was incubated with 0.5 mL of crude lipase extract for 5 min at 55 °C, and then titrated with 0.05 M NaOH using a pH STAT-type Metrohm (model 842-Titrando) Potentiometer according to Stuer et al., [22]. One unit of lipase activity is defined as the release of 1 μmol of *p*NP, or fatty acids, per min per mL of enzyme solution.

2.2.10 Determination of Physicochemical Parameters of Crude Lipase Extract from *Botryosphaeria ribis* EC-01

2.2.10.1 Optimum pH and temperature

The effects of pH and temperature on *B. ribis* EC-01 lipase activity were evaluated using *p*NP-P as substrate by incubating CLE in 0.05 M of different buffer systems (KCl/HCl: pH 1-2, citrate-phosphate: pH 3-7, sodium phosphate: pH 6-8, TRIS/HCl: pH 8-9 and glycine/NaOH: pH 9-10) for 2 min at 30 °C [23]. Following the determination of the optimal pH, the CLE was incubated for 2 min at pH 8.0 (0.05 M sodium phosphate buffer) at temperatures ranging from 30 ° to 65 °C.

2.2.10.2 Temperature and pH stability

Crude lipase extract was incubated at the following temperature: 30, 40, 50, 60, 65, 70, 75 and 85 °C for times ranging from 5 min to 3 h. For temperatures between 30 and 55 °C, a 24-h incubation period was also included. At the pre-established time intervals, aliquots were removed and assayed for lipase activity under standard assay conditions. The influence of pH on enzyme stability was evaluated by incubating CLE (diluted 1:1 in the buffer solutions described in 2.2.10.1, as well as in distilled water) for 1 h at 30 °C followed by assay of lipase activity under standard assay conditions.

2.2.10.3 Effect of salts, detergents and organic solvents

Crude lipase extract was incubated with different metal salt solutions (1:1 ratio) of the cations: Ag⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, K⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Na⁺, Zn²⁺ at concentrations of 1, 5, 10, 25, 50 and 100 mM at 30 °C in water for 1 h. Thereafter, an aliquot (0.1 ml) was removed, diluted with water where necessary, and assayed for lipase activity against *p*NP-P as described above. Similarly, CLE was incubated at 30 °C for 1 h in the presence of EDTA (10 mM) and surfactants, Tween 80, SDS (sodium dodecyl sulfate) and Triton X-100, at a final concentration of 0.01% (w/v), and assayed for lipase activity as described above [23].

Stability in organic solvents was evaluated by the protocol as outlined by Sztajer et al. [24], except that the CLE was incubated at 30 °C. The solvents included acetone,

butanol, hexane, isooctane, isopropanol or toluene at 99.3 % (v/v); glycerol (50 %, v/v); and ethanol and methanol (each at 1, 2, 5, 10, 25, 50 and 99.3 %, v/v). Residual lipase activity was assayed against *p*NP-P as described above.

2.2.10.4 Substrate specificity

Lipase activity was tested against various synthetic substrates consisting of fatty-acyl esters of *p*-nitrophenyl (acetate, butyrate, caproate, caprate, palmitate and stearate), different triacylglycerols (tributylin, tricapylin and triolein) [23], and a food-grade commercial soybean oil. The reactions were performed at 55 °C (pH 8.0) for 2 min using the synthetic substrates, and for 5 min by titrimetry (pH STAT).

2.2.11 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) Zymogram for Lipase Activity

SDS-PAGE was performed according to Laemmli [25]. Crude lipase extract (dialysed against deionized water) was diluted 3-fold in concentrated sample buffer (0.2 g SDS, 1.5 mL glycerol, 0.25 mL 2-mercaptoethanol, 0.4 mg bromophenol blue and 1.0 mL distilled water), and aliquots containing 1-2 µg protein applied to each lane of the gel prepared with 12 % (w/v) polyacrylamide. Sodium phosphate buffer (0.05 M) was used to maintain a pH of 8.0. CLE in this case was not heated at 100 °C (non-denaturing). Following electrophoresis (100 V and 50 mA), lipase activity was detected by flooding the gel with a solution of 4-methyl-umbelliferyl-butyrate (MUF-butyrate, 100 µM, pH 8.0) followed by UV irradiation (302 nm) where bands containing lipase fluoresced a light-blue color [26]. Another gel, prepared under the same conditions and run under denaturing conditions, was stained with silver nitrate [27]. BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen, bands from 181.8 to 6.0 kDa) was used as molecular weight markers.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 QUALITATIVE AND QUANTITATIVE SELECTION OF LIPASE-PRODUCING *BOTRYOSPHAERIA* ISOLATES

Of the nine isolates of *Botryosphaeria* spp. examined, only *B. ribis* EC-01 and *B. rhodina* MMGR (*L. theobromae*, isolate from soursop) showed strong evidence of lipolytic activity by the Rhodamine B-dye zymogram procedure. When lipase is produced, the fatty acids released during hydrolysis of triacylglycerols are thought to form a complex with Rhodamine B producing an orange-fluorescent colour under UV light [28]. A similar observation was reported for *Penicillium aurantiogriseum* [19].

The composition of the nutrient medium resulted in *B. rhodina* MMBJ (*L. theobromae*, isolate from eggplant) producing pycnidia [29]; small bottle-shaped structures containing conidia around which small orange-fluorescent halos were observed under UV light indicating lipolytic activity in the conidia. *B. rhodina* MMLR (*L. theobromae*, isolate from orange) by contrast did not show lipolytic activity, although it completely consumed the Rhodamine B dye after five days growth.

Quantitative evaluation of lipase production by the 9 fungal isolates grown in liquid submerged culture on various vegetable oils and glycerol showed highest specific lipase activity for *B. ribis* EC-01 grown on soybean oil (22.8 ± 5.58 U/mg) and glycerol (22.3 ± 3.21 U/mg). This fungal isolate also produced lipases on each of the other vegetable oils examined (Table 1). Apart from *B. rhodina* MMLR, which did not produce significant lipase activity (in agreement with the zymogram findings), all of the remaining 8 isolates of *Botryosphaeria* spp. produced lipase on the various vegetable oils and glycerol, but at lower enzyme titres. The qualitative zymogram lipolytic profiles closely mirrored the quantitative lipase evaluations, with *B. ribis* EC-01 and *B. rhodina* MMGR being the best lipase producers.

When glycerol was used as sole carbon source, each of the *Botryosphaeria* spp. isolates examined produced decreased amounts of biomass (mean 4.07 ± 1.35 g mycelium/L) compared to that produced on the vegetable oils (mean 8.67 ± 1.20 g mycelium/L). In the case of *B. ribis* EC-01 grown on glycerol, this isolate produced higher lipase titres and less biomass compared to the other vegetable oils evaluated (data not shown).

3.2 EFFECT OF SHAKING OF CULTURE MEDIUM IN PRODUCTION OF LIPASE BY *B. RIBIS* EC-01

Considering there were no reports in the literature on lipase production by *Botryosphaeria* spp., selection of isolates capable of producing this enzyme was performed in baffled Erlenmeyer flasks as was the protocol of our previous studies on laccase production with another *Botryosphaeria* spp. [18]. This modification provided an increase in the degree of aeration of the cultures, compared with standard, unbaffled Erlenmeyer flasks. Aeration had previously been demonstrated an essential requirement for the production of laccases by *B. rhodina* MAMB 05 [18]. Results for the production of lipase by *B. ribis* EC-01 in standard Erlenmeyer flasks showed that shaking was important for the production of this enzyme. Enzyme titres under shaking conditions (standard flasks) was 98 % higher than that observed in static cultures, and 75 % higher than those observed in baffled flasks, indicating that increased aeration actually decreased lipase titres. High shaking speeds (>300 rpm) was reported to cause shearing of the mycelium (*Geotrichum* sp.) leading to a decrease in lipase activity [30]. The presence of baffle indentations in the glass wall of the shake flasks would also increase the degree of shearing besides aeration within these flasks, and therefore it appears that shearing also affected lipase production by *B. ribis* EC-01.

3.3 PRODUCTION OF LIPASE BY *BOTRYOSPHAERIA RIBIS* EC-01 ON DIFFERENT CARBON SOURCES

Compounds such as the free fatty acids (oleic, stearic and palmitic acids), glycerol and vegetable oils (maize, olive, soybean and sunflower) have been reported as inducers of microbial lipases [7]. Among the various carbon sources evaluated for production of lipase by *B. ribis* EC-01, the highest lipase specific activity achieved was for oleic acid (247.4 ± 10.50 U/mg) (Table 2). Free fatty acids such as stearate (316.7 ± 8.34 U/mL) and palmitate (283.5 ± 11.34 U/mL), as well as soybean oil, served as best substrates for the production of lipase when emulsified by surfactants. Lipase was also produced in the presence of the triolein (78.6 ± 0.15 U/mL), whereas tributyrin and tricaprylin appeared toxic to this fungal isolate at concentrations of 1.0 % (w/v), as judged by a decrease in the biomass produced. Tributyrin has been reported to inhibit growth of *Lactobacillus* in meat and lipase production [31], but high lipase titres (70 U/mL) resulted when the yeast, *Issatchenkia orientalis*, was cultured in the presence of tributyrin [7]. Thus, tributyrin may, or may not, be toxic to lipase-producing microorganisms.

Of the vegetable oils examined in this work, highest specific activity was observed for castor oil (two-fold higher than soybean oil). Castor oil is comprised of 90 % ricinoleic acid, which contains 12 hydroxyl groups along the oleic acid ($C_{18:1}$) chain [32]. Enzymatic removal of the hydroxyl groups from ricinoleic acid by microbial species results in oleic acid, and as oleic acid was found to be a good carbon source for lipase production by *B. ribis* EC-01 (Table 2), this may explain why castor oil resulted in high lipase titres.

The surfactants Tween and Triton X-100 contain acyl-ester bonds that mimic substrates for lipase catalysis [33], and affected lipase production by *B. ribis* EC-01 (Table 2). Tweens of different fatty-acyl chain length (Tween 20, 40, 60, 80) as sole carbon sources demonstrated an increase in enzyme titres as the chain length increased. Production of lipase on Triton X-100 as carbon source was similar to the enzyme titres resulting from Tweens 20 and 40, and enzyme titres were affected by the final concentrations of the surfactant, being higher at 1.0 % than 0.1 % (w/v). Addition of Tween 80 or Triton X-100 to the culture medium containing soybean oil favored the production of lipase by *B. ribis* EC-01. As these surfactants interfered with the assay of protein [20], specific lipase activities could not be determined when 1 % of these surfactants were incorporated into the nutrient medium.

Glycerol was evaluated at 4 concentrations as sole carbon source for lipase production by *B. ribis* EC-01, and highest enzyme titres (16.5 ± 2.99 U/mL) resulted at a concentration of 4.0 % (C/N and C/P ratios of 18.7 and 13.5, respectively) (Table 2). Production of lipase by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* was inhibited by glycerol and glucose [34], and both of these substrates likewise inhibited synthesis of lipase by *C. rugosa* [35]. On the otherhand, production of a thermostable lipase by *Bacillus* sp. was enhanced by the presence of glycerol (1 %) in the culture medium [36].

B. ribis EC-01 grew on all of the carbohydrate sources evaluated (see Table 2) producing lipase, thus demonstrating that lipase was a constitutive enzyme in this fungal isolate, and its production was not regulated by glucose or glycerol (catabolite repressors). Among the carbohydrates evaluated, highest lipase production (6.9 ± 0.27 U/mL) occurred on lactose.

There was a significant variation in the production of biomass by *B. ribis* EC-01 when grown on the different carbon sources evaluated as shown in Table 2. The fungus grew best on triolein (17.71 ± 0.45 g mycelium/L), followed next by soybean oil (12.67 ± 1.48 g mycelium/L).

3.4 PROPERTIES OF THE CRUDE LIPASE PREPARATION OF *BOTRYOSPHERA RIBIS* EC-01

B. ribis EC-01 lipase showed optimal activity at 55 °C and pH 8.0. Optimal pH of lipases from the genus *Aspergillus* have ranged from acid (pH 2.5) [37] to neutral [38]. However, lipases from *Thermomyces lanuginosa* [39] and *Fusarium oxysporum* [40] showed optimal activity at pH 8.0, and lipases from *F. glubulosum* [41] between pH 10 and 11. Usually, the temperature for optimal activity of lipases has been reported to range from 30 to 50 °C [7, 40]. However, higher temperatures have been reported for some bacteria and filamentous fungi lipases. For example, the lipase of *P. aurantiogriseum* [23] showed optimal activity between 50 and 70 °C.

The crude lipase from *B. ribis* EC-01 retained 90 % of its initial activity after 24 h at 30 ° to 55 °C, and 70 % at 65 °C after 1 h incubation (Fig. 1). A lipase produced by *P. aurantiogriseum* [23] retained 32 % of its activity after 0.5 h at 50 °C, while a lipolytic extract from *Aspergillus niger* retained ~80 % of its original activity after 1 h at 55 °C [42]. An acidic lipase from *A. niger* was reported to retain 63 % of its relative activity at 70 °C for 5 h [37]. The crude lipase from *B. ribis* EC-01 besides being active at alkaline pH, a requirement for industrial applications, also showed good thermal stability. Thermal stability of lipases can be influenced by factors such as pH and the presence of metal ions, and these are related to structural features of the enzyme [43]. Changes in pH ranging from 1.0 to 10.0 showed little effect on relative lipase activity from *B. ribis* EC-01; ~80 % of the original activity was retained after 1 h at 30 °C. A similar observation was reported for a lipase from *A. niger*; 1 h at pH 2.0 to 10.0 (37 °C) resulted in full retention of lipase activity [42].

The effect of different metal cations and detergents on the activity of the crude lipase from *B. ribis* EC-01 are shown in Table 3. An increment in lipase activity was observed by the presence of Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , Na^+ and Ba^{2+} , while Cu^{2+} appeared somewhat inhibitory. Ca^{2+} is a known cofactor for some types of lipases [24], and the presence of Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} and Mn^{2+} likewise have been reported to increase lipase activity in *P. aurantiogriseum* [23]. The crude lipase from *B. ribis* EC-01 was partially inhibited (34 %) by 10.0 mM Hg^{2+} , while lower concentrations of 1.0 mM did not appear inhibitory. A lipase from *Rhizopus oryzae* was inhibited by Hg^{2+} and Cu^{2+} ions [44], while a lipase from *P. aurantiogriseum* was totally inhibited by $HgCl_2$ [23]. Chelating agents such as ethylene diaminetetracetic acid (EDTA) have been reported as not having a significant effect on alkaline lipase activity [5, 45], and this was also found for the lipase from *B. ribis* EC-01. None of the detergents tested displayed a negative effect on *B. ribis* EC-01 lipase activity

(Table 3). Actually, Tween 80 increased lipase activity by 30 %, and SDS by 10 %, while the neutral detergent, Triton X-100, did not appear to affect lipase activity. Detergents can cause denaturation of lipase, or hamper its aggregation, thus affecting its activity [23]. Lipase from *F. oxysporum* was inhibited to the extent of 30 % in the presence of Tween 80, whereas Triton X-100 increased its activity by 11 % [40], while Triton X-100 was reported to be inhibitory (50 %) to the lipase of *P. aurantiogriseum* [23].

Stability of fungal and bacterial lipases in organic solvents is rather unusual, and so is the activation of this enzyme by these solvents [26]. Activity of crude lipase from *B. ribis* EC-01 was evaluated in the presence of water-miscible solvents such as acetone, methanol, ethanol, isopropanol and butanol at concentrations of 99.3% (v/v) when left for 1 h at 30 °C. The relative residual lipase activities are shown in Table 4 and ranged between 12 and 38 %. This enzyme, however, remained stable in the presence of up to 50 % methanol and ethanol, retaining almost full activity. The *B. ribis* EC-01 crude lipase preparation therefore appears suitable for use in transesterification reactions in biodiesel production in which methanol or ethanol are used as co-reactants [6]. Furthermore, this lipase preparation was also stable to high concentrations of glycerol (50 %); an end-product of biodiesel production. Stability in organic solvents is an important feature for lipases, as these enzymes may support the development of applications as catalysts in synthesis reactions by predicting which solvents can be used in reaction media [23]. Lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis* showed relative activities of 0 and 22 % in the presence of methanol and ethanol, respectively [46]. Among the water immiscible solvents, the highest stability observed for the crude lipase from *B. ribis* EC-01 was in iso-octane (68 % residual activity, Table 4), which had the highest log *P* value of the solvents tested [47]. Hydrophilic solvents ($-2.5 < \log P < 0$), such as acetone and ethers, are usually not compatible with enzyme activity, whereas water-immiscible solvents ($2 < \log P < 4$), such as alkanes or haloalkanes, retain the catalytic activity as they don't strip-off the crucially-bound water from the enzyme surface [23]. The lipase from *Pseudomonas aeruginosa* was stable in isooctane retaining 97 % of its residual activity [47], while the enzyme from *M. hiemalis f. hiemalis* retained full activity in this solvent [46].

Results from substrate specificity tests showed that the crude lipase from *B. ribis* EC-01 hydrolysed all of the substrates examined, but to different extents. Hydrolytic activity towards *p*-nitrophenyl-fatty acyl esters (acetate, butyrate, caproate, caprate, palmitate and stearate) was minimal on *p*NP-acetate, and increased as the fatty-acyl chain length increased up to palmitate. The activity towards *p*NP-stearate was 30 % lower than that towards *p*NP-P. When triacylglycerols (tributyrin, tricapyrin and triolein) were used as lipase

substrates and assayed by titrimetry, an increase in enzyme activity was observed as the fatty-acyl chain length decreased. Soybean oil was included as a reference for comparative purposes. Tributyrin was hydrolysed to the same extent as soybean oil, and did not appear to be inhibitory to this enzyme. As triolein served as a lipase substrate for hydrolysis, this demonstrated that the lipase of *B. ribis* EC-01 was a *true* lipase, since esterases (E.C. 3.1.1.1) generally are unable to hydrolyse triolein, and prefer chain lengths of 10-12 carbons [1]. A similar observation was reported for a lipase from *Bacillus megaterium* [26].

Development of SDS-PAGE zymograms for the detection of lipase activity using MUF-butyrate showed two bands of lipolytic activity at 45 and 15 kDa. These results are consistent with molecular masses of lipases cited in the literature that ranged from 20 to 60 kDa [48]. The enzyme with the lowest molecular mass reported (between 6.0 and 8.0 kDa) was from *Propionibacterium acid-propionici* [49].

Acknowledgements

The authors are grateful to Cassiano C. Silva for translation of the original Portuguese text into English. Babaçu oil was kindly donated by Dr. Heizir F. de Castro, Escola de Engenharia de Lorena – USP, Lorena – SP, Brazil. Arnaldo F. da Silva Filho, José P. da Graça and Virgínia C. A. Falcão are gratefully acknowledged for their assistance with some of the experimental work. The authors gratefully acknowledge CNPq (Projeto 474340/2006-6) and CAPES - Brazil for financial support.

References

- [1] Jaeger KE, Eggert T. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13:390-397.
- [2] 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 Biochem* 2008; 43:626-633.
- [3] Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. Industrial enzymes applications. *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13:345-351.
- [4] Jaeger KE, Reetz MT. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *TIBTECH* 1998; 16:396-403.
- [5] Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv* 2001; 19:627-662.
- [6] Ranganathan SV, Srinivasan LN, Muthukumar K. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technol* 2008; 99:3975-3981.
- [7] Costas M, Deive FJ, Longo MA. Lipolytic activity in submerged cultures of *Issatchenkia orientalis*. *Process Biochem* 2004; 39:2109-2114.
- [8] Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 64:763–781.
- [9] Slippers B, Wingfield MJ. *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biol Rev* 2007; 21:90-106.
- [10] Barbosa AM, Dekker RFH, Hardy GE. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye, Poly R-478. *Lett Appl Microbiol* 1996; 23:93-96.
- [11] Saldanha RL, Garcia JE, Dekker RFH, Villas-Boas LA, Barbosa AM. Genetic diversity among *Botryosphaeria* isolates and their correlation with cell wall-lytic enzyme production. *Brazil J Microbiol* 2007; 38:259-264.
- [12] Barbosa AM, Steluti RM, Dekker RFH, Cardoso MS, Corradi da Silva ML. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3; 1→6)-β-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. *Carbohydr Res* 2003; 338:1691-1698.

- [13] Dekker RFH, Barbosa AM, Giese EC, Godoy SDS, Covizzi LG. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *Int Microbiol* 2007; 10:177-185.
- [14] Novo Nordisk A/S. Alkaline lipolytic enzyme. Hirayama; S.; Halkier, T. 1996. World Intellectual Property Organization. International Application Published Under The Patent Cooperation Treaty (PCT). WO 96/30502.
- [15] Silveira RLVA, Krugner TL, Silveira RI, Gonçalves AN. Efeito de boro na suscetibilidade de *Eucalyptus citriodora* a *Botryosphaeria ribis* e *Lasiodiplodia theobromae*. *Fitopatol Brasil* 1996; 2: 482-485.
- [16] Garcia JE, Vilas-Boas LA, Dekker RFH, Fúngaro MHP, Barbosa AM. Molecular identification of a species of *Botryosphaeria* sp.; *Botryosphaeria rhodina*. GenBank, 2004. Acession number: AY612337.
- [17] Vogel HJ. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Microb Genet Bull* 1956; 13:42-43.
- [18] Dekker RFH, Barbosa AM. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. *Enz Microbial Technol* 2001; 28:81-88.
- [19] Lima VMG, Krieger N, Sarquis MIM, Mitchell DA, Ramos LP, Fontana JD. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technol Biotechnol* 2003; 41:105-110.
- [20] Hartree EF. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 1972; 48:422-427.
- [21] Winkler UK, Stuckmann M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 1979; 138:663-670.
- [22] Stuer W, Jaeger KE, Winkler UK. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1986; 168:1070-1074.
- [23] Lima VMG, Krieger N, Mitchell DA, Fontana JD. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochem Eng J* 2004; 18:65-71.

- [24] Sztajer H, Lünsdorf H, Erdmann H, Menge U, Schmid R. Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. *Biochim Biophys Acta- Lipids and Lipid Metabolism* 1992; 1124:253-261.
- [25] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
- [26] Lima VMG, Krieger N, Mitchell DA, Baratti JC, Filippis I, Fontana JD. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. *J Mol Catalysis B: Enzymatic* 2004; 31:53-61.
- [27] Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins: RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 1987; 8: 93-99.
- [28] Kouker G, Jaeger KE. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53:211-213.
- [29] Vasconcelos AFD, Dekker RFH, Barbosa AM, Paccola-Meirelles L. Comparison of the laccases, molecular marker proteins and induction of pycnidia by three species of botryosphaeriaceous fungi. *Mycoscience* 2001; 42:543-548.
- [30] Burket JFM, Maldonado RR, Maugeri Filho F, Rodrigues MI. Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. *J Chem Technol Biotechnol* 2005; 80:61-67.
- [31] Papon M, Talon R. Factors affecting growth and lipase production by meat lactobacilli strains and *Brochothrix thermosphacta*. *J Appl Microbiol* 1988; 64:107-115.
- [32] Oliveira D, Oliveira JV, Faccio C, Menoncin S, Amroginski C. Influência das variáveis de processo na alcoólise enzimática de óleo de mamona. *Ciência Tecnol Aliment* 2004, 24:178-182.
- [33] Boekema BKHL, Beselin A, Breuer M, Hauer B, Koster M, Rosenau F, Jaeger KE, Tommassen J. Hexadecane and Tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73:3838-3844.
- [34] Rapp P. Production, regulation and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Enz Microbial Technol* 1995; 17:832-838.
- [35] Dalmau E, Montesinos JL, Lotti M, Casas C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enz Microbial Technol* 2000; 26:657-663.

- [36] 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. *Can J Microbiol* 2004; 50:361-368.
- [37] Mahadik ND, Puntambekar US, Bastawde KB, Khire JM, Gokhale DV. Production of acid lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochem* 2002; 38:715-721.
- [38] Saxena RK, Davidson WS, Sheoran A, Giri B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochem* 2003; 39:239-247.
- [39] Fernandez MLM, Krieger N, Baron AM, Zamora PP, Ramos LP, Mitchell DA. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/isooctane reversed micellar system. *J Mol Catalysis B: Enzymatic*, 2004, 30:43-49.
- [40] Prazeres JN, Cruz JAB, Pastore GM. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. *Brazil J Microbiol* 2006; 37:505-509.
- [41] Gulati R, Isar J, Kumar V, Prasad AK, Parmar VS, Saxena RK. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. *Pure Appl Chem* 2005; 77:251-262.
- [42] Pera LM, Romero CM, Baigori MD, Castro GR. Catalytic properties of lipase extracts from *Aspergillus niger*. *Food Technol Biotechnol* 2006; 44:247-252.
- [43] Zhu K, Jutila A, Tuominen EKJ, Patkar SA, Svendsen A, Kinnunen PKJ. Impact of the tryptophan residues of *Humicola lanuginosa* lipase on its thermal stability. *Biochim Biophys Acta -Protein Structure and Molecular Enzymology* 2001; 1547:329-338.
- [44] Hiol A, Jonzo MD, Rugani N, Druet D, Sarda L, Comeau LC. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enz Microbial Technol* 2000; 26: 421-430.
- [45] Lin SF, Chiou CM, Yeh C, Tsai YC. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Appl Environ Microbiol* 1996; 18:1169-1174.
- [46] Hiol A, Jonzo MD, Druet D, Comeau L. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. *Enz and Microbial Technol* 1999; 25:80-87.

- [47] Ruchi G, Anshu G, Khare SK. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application. *Bioresource Technol* 2008; 99:4796-4802.
- [48] Mala JGS, Takeuchi S. Understanding structural features of microbial lipases – An overview. *Anal Chem Insights* 2008; 3:9-19.
- [49] Sarada R, Joseph R. Purification and properties of lipase from the anaerobe *Propionibacterium acidi-propionici*. *J Am Oil Chem Soc* 1992; 69:974-977.

Table 1 – Specific lipase activities of nine isolates of *Botryosphaeria* spp. cultivated on vegetable oils and glycerol

Isolates of <i>Botryosphaeria</i> spp.	Specific lipase activity ^a (U/mg protein)								
	Vegetable oils								Glycerol
	Babaçu	Canola	Cotton seed	Maize	Olive	Sesame	Soybean	Sunflower	
<i>B. ribis</i> EC 01	3.2 ± 1.87	14.7 ± 2.35	17.6 ± 0.71	15.2 ± 0.57	13.7 ± 0.32	11.9 ± 0.32	22.8 ± 5.58	16.4 ± 1.03	22.3 ± 3.21
<i>B. rhodina</i> MAMB 05	0.1 ± 0.05	0.7 ± 0.06	0.1 ± 0.06	0.3 ± 0.04	0.2 ± 0.04	0.4 ± 0.04	0.3 ± 0.00	0.3 ± 0.07	0.9 ± 0.16
<i>B. rhodina</i> MC 01 ^b	0.2 ± 0.00	0.7 ± 0.05	0.3 ± 0.02	0.5 ± 0.02	0.3 ± 0.08	0.4 ± 0.11	0.4 ± 0.20	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.07
<i>B. rhodina</i> MMBJ ^b	0.8 ± 0.07	0.7 ± 0.16	0.4 ± 0.07	0.9 ± 0.17	0.7 ± 0.34	0.6 ± 0.16	0.7 ± 0.01	0.5 ± 0.16	0.7 ± 0.51
<i>B. rhodina</i> MMGR ^b	1.8 ± 0.11	1.7 ± 0.25	0.4 ± 0.07	1.2 ± 0.57	1.3 ± 0.15	0.3 ± 0.08	1.3 ± 0.51	0.4 ± 0.26	0.5 ± 0.13
<i>B. rhodina</i> MMLR ^b	0.1 ± 0.02	0.04 ± 0.04	0.1 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.03	0.02 ± 0.02	0.1 ± 0.07
<i>B. rhodina</i> MMMFO ^b	0.8 ± 0.28	0.7 ± 0.07	0.4 ± 0.05	0.3 ± 0.08	0.4 ± 0.14	0.5 ± 0.02	0.3 ± 0.09	0.2 ± 0.04	0.4 ± 0.17
<i>B. rhodina</i> MMMFR ^b	0.6 ± 0.06	0.4 ± 0.04	0.4 ± 0.02	0.6 ± 0.30	0.5 ± 0.00	0.4 ± 0.10	0.4 ± 0.02	0.4 ± 0.04	0.7 ± 0.11
<i>B. rhodina</i> MMPI ^b	0.4 ± 0.29	0.9 ± 0.37	0.4 ± 0.04	0.6 ± 0.29	0.3 ± 0.00	0.5 ± 0.15	0.5 ± 0.18	0.5 ± 0.17	0.2 ± 0.12

^a pNP-P was used to determine lipase activity.

^b *Lasiopodia theobromae* (anamorph form of *Botryosphaeria rhodina*)

Table 2 – Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on different carbon sources

CARBON SOURCES (%, w/v or v/v ^a)	Lipase activity^b (U/mL)	Specific lipase activity^b (U/mg)	Final pH^c	Mycelial biomass (g/L)
FATTY ACIDS				
Oleic acid (1.0)	173.3 ± 2.04	247.4 ± 10.50	7.37 ± 0.02	11.26 ± 1.67
Linoleic acid (1.0)	47.3 ± 6.68	77.9 ± 10.24	6.35 ± 0.07	9.79 ± 0.29
Linolenic acid (1.0)	0.02 ± 0.00	0.0 ± 0.00	4.90 ± 0.03	3.00 ± 0.40
TRIACYLGLYCEROLS				
Tributylin (1.0)	0.04 ± 0.02	0.6 ± 0.09	3.69 ± 0.00	1.68 ± 0.08
Tricaprylin (1.0)	0.01 ± 0.01	0.2 ± 0.05	5.32 ± 0.07	2.80 ± 0.21
Triolein (1.0)	78.6 ± 0.15	128.2 ± 4.20	7.14 ± 0.01	17.71 ± 0.45
GLYCEROL				
Glycerol (1.0)	12.8 ± 0.01	77.4 ± 0.33	6.01 ± 0.07	7.94 ± 0.74
Glycerol (2.0)	12.6 ± 0.56	87.0 ± 11.84	5.93 ± 0.24	7.88 ± 1.02
Glycerol (4.0)	16.5 ± 2.99	94.8 ± 11.23	5.66 ± 0.27	8.29 ± 1.67
Glycerol (6.0)	13.7 ± 0.90	82.1 ± 7.09	5.61 ± 0.25	8.08 ± 1.13
VEGETABLE OILS				
Castor oil (1.0)	40.9 ± 5.40	191.2 ± 23.06	6.71 ± 0.33	7.46 ± 0.06
Soybean oil (0.5) ^a	34.8 ± 8.60	93.6 ± 0.03	6.51 ± 0.07	9.10 ± 0.35
Soybean oil (1.0) ^a	34.7 ± 5.70	76.2 ± 10.05	6.45 ± 0.12	12.67 ± 1.48
SURFACTANTS				
Tween 20 (1.0)	6.3 ± 0.35	^d	6.59 ± 0.05	5.00 ± 0.09
Tween 40 (1.0)	6.9 ± 0.17	^d	6.38 ± 0.01	4.17 ± 0.50
Tween 60 (1.0)	47.4 ± 6.28	^d	6.26 ± 0.02	4.99 ± 0.08
Tween 80 (1.0)	71.8 ± 2.68	^d	5.15 ± 0.03	7.17 ± 0.23
Tween 80 (0.1)	10.0 ± 0.25	15.4 ± 0.48	6.59 ± 0.07	3.60 ± 0.10
Triton X-100 (1.0)	5.9 ± 0.82	^d	6.71 ± 0.01	3.84 ± 0.40
Triton X-100 (0.1)	8.8 ± 0.19	10.2 ± 0.69	6.19 ± 0.03	2.23 ± 0.81
EMULSIFIED LIPIDS				
Stearic acid (1.0) + Triton X-100 (0.1)	316.7 ± 8.34	^d	6.55 ± 0.00	12.11 ± 0.25
Palmitic acid (1.0) + Triton X-100 (0.1)	283.5 ± 11.34	^d	6.50 ± 0.03	9.37 ± 3.08
Soybean oil (1.0) ^a + Tween 80 (0.1)	101.3 ± 2.40	^d	7.02 ± 0.00	11.74 ± 0.02
Soybean oil (1.0) ^a + Triton X-100 (0.1)	105.6 ± 3.88	^d	6.53 ± 0.10	7.82 ± 1.26
SUGARS				
Fructose (1.0)	0.8 ± 0.09	3.3 ± 0.30	6.00 ± 0.07	6.76 ± 0.81
Glucose (1.0)	0.6 ± 0.04	4.0 ± 0.22	6.70 ± 0.02	6.57 ± 0.25
Lactose (1.0)	6.9 ± 0.27	18.5 ± 0.68	6.23 ± 0.16	7.98 ± 0.07
Sucrose (1.0)	0.7 ± 0.04	5.5 ± 0.96	6.39 ± 0.17	5.75 ± 0.27
Commercial sucrose (1.0)	0.7 ± 0.04	4.4 ± 0.65	6.40 ± 0.15	6.64 ± 0.33

^b pNP-P used as substrate to determine lipase activity. ^c initial pH 5.8-6.0. ^d Total protein could not be assayed due to interference of Tween and Triton X-100 by the Hartree method [20].

Table 3 – Influence of metal cations, EDTA and surfactants on the activity of a crude lipase from *Botryosphaeria ribis* EC-01

Metal ions^a, EDTA and Detergents	Relative lipase activity^b (%)
Control	100.0 ± 0.07
Mn ²⁺ (MnCl ₂)	141.7 ± 0.66
Mg ²⁺ (MgCl ₂)	140.5 ± 3.18
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	130.8 ± 1.19
K ⁺ (KCl)	118.3 ± 0.66
Zn ²⁺ (ZnCl ₂)	110.7 ± 0.93
Na ⁺ (NaCl)	110.0 ± 0.27
Ba ²⁺ (BaCl ₂)	108.4 ± 3.04
Ag ⁺ (AgNO ₃)	106.5 ± 0.27
K ⁺ (KCN)	104.0 ± 1.46
Co ²⁺ (CoCl ₂)	103.9 ± 1.33
Cu ²⁺ (CuSO ₄)	81.5 ± 1.86
Hg ²⁺ (Hg Cl ₂)	99.7 ± 0.00
Hg ²⁺ (HgCl ₂ ^c)	66.3 ± 0.89
EDTA (10 mM)	112.0 ± 0.40
Tween 80 ^d	129.1 ± 0.54
SDS ^d	115.2 ± 0.40
Triton X-100 ^d	103.2 ± 0.67

^a 1 mM^b after 1 h at 30 °C^c 10 (mM)^d 0.01% (w/v)

Table 4 – Influence of different solvents on the activity of a crude lipase from *Botryosphaeria ribis* EC-01

Solvents (% v/v)	Relative residual activity (%) ^a
Control	100.0 ± 0.872
Acetone (99.3)	23.1 ± 0.006
Butanol (99.3)	25.5 ± 0.006
Isopropanol (99.3)	23.1 ± 0.017
Hexane ^b (99.3)	15.0 ± 0.001
(log <i>P</i> [*] 3.5)	
Isooctane ^c (99.3)	68.6 ± 0.002
(log <i>P</i> 4.5)	
Toluene ^d (99.3)	7.0 ± 0.002
(log <i>P</i> 2.5)	
Glycerol (50.0)	108.9 ± 2.630
Methanol	
(1.00)	105.5 ± 1.928
(2.00)	103.6 ± 0.252
(5.00)	102.7 ± 1.853
(10.0)	104.5 ± 0.504
(25.0)	102.7 ± 0.668
(50.0)	102.5 ± 0.008
(99.3)	12.6 ± 0.004
Ethanol	
(1.00)	99.9 ± 2.105
(2.00)	99.8 ± 1.512
(5.00)	97.7 ± 0.592
(10.0)	98.1 ± 2.861
(25.0)	97.0 ± 3.365
(50.0)	95.7 ± 0.024
(99.3)	37.9 ± 0.001

^a 1 h at 30 °C; ^b *p*NP-P used to assay lipase activity; Complete solvent evaporation at room temperature for ^b 4.5 h, ^c 20 h and ^d 30 h; ^{*} log *P* (logarithm of the partition coefficient of a particular solvent between *n*-octanol and water, [47])

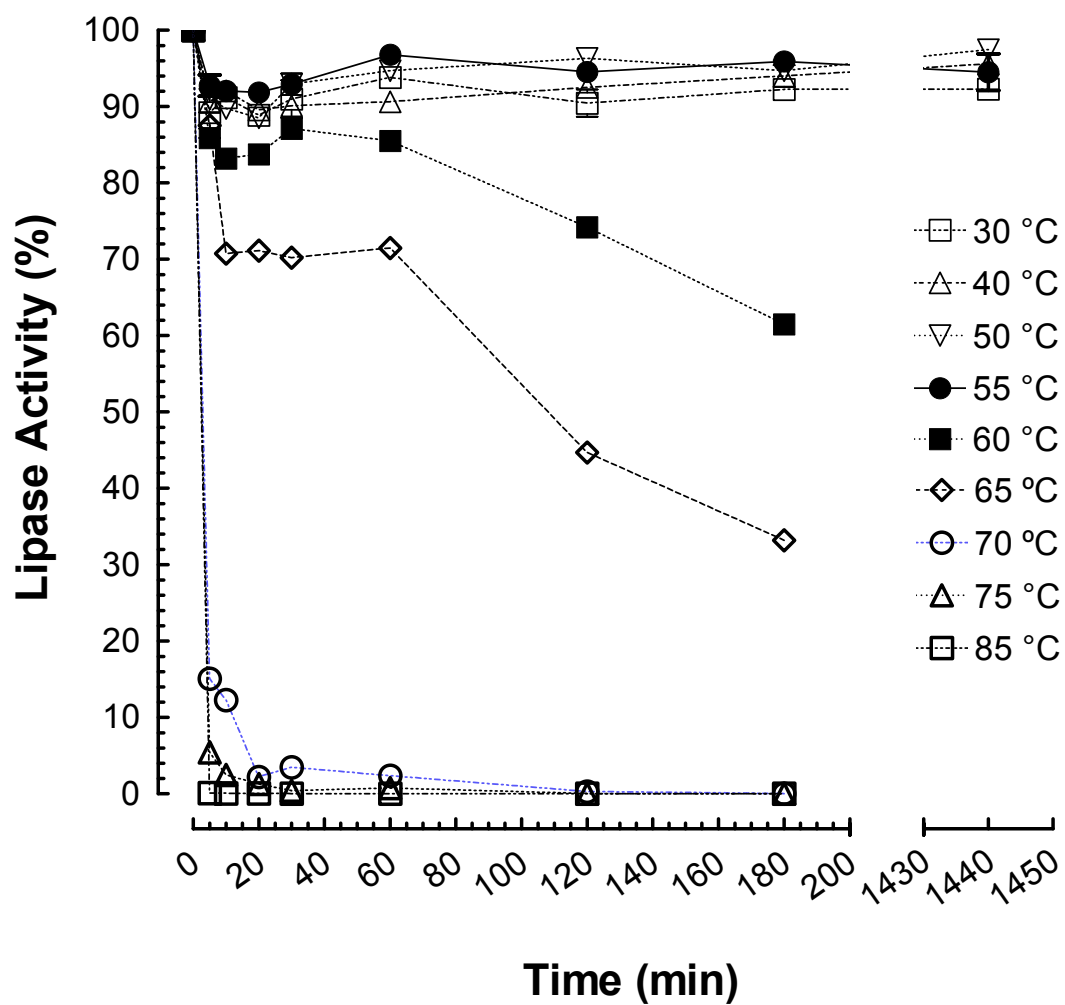


Figure 1 – Stability of the crude lipase from *Botryosphaeria ribis* EC-01 at different temperatures ranging from 30 ° to 85 °C (3 h), and 30 ° to 55 °C (24 h).

5.2.2 Artigo B

**“MELHORAMENTO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR *BOTRYOSPHERA RIBIS*
EC-01 EM ÓLEO DE SOJA E GLICEROL COMO FONTES DE CARBONO
UTILIZANDO-SE PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO DE MISTURAS”**

(ESCRITO SEGUNDO AS NORMAS DO PERIÓDICO PROCESS BIOCHEMISTRY)

**Josana M. Messias, Bruna Z. da Costa, Valéria M. G. de Lima, Robert F. H. Dekker,
Ieda S. Scarminio, Maria I. Rezende, Aneli de M. Barbosa***

**IMPROVEMENT ON LIPASE PRODUCTION BY *BOTRYOSPHERIA RIBIS* EC-01
ON SOYBEAN OIL AND GLYCEROL AS CARBON SOURCES USING A
STATISTICAL PLANNING OF MIXTURES**

**MELHORAMENTO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR *BOTRYOSPHERIA RIBIS*
EC-01 EM ÓLEO DE SOJA E GLYCEROL COMO FONTES DE CARBONO
UTILIZANDO-SE PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO DE MISTURAS**

**Josana M. Messias⁵, Bruna Z. da Costa^a, Valéria M. G. de Lima^b, Robert F. H. Dekker^c,
Ieda S. Scarminio^d, Maria I. Rezende^a, Aneli de M. Barbosa^{a*}**

Resumo

Botryosphaeria ribis EC-01 foi previamente selecionado como produtor de lipase em diferentes óleos vegetais, glicerol e outras fontes de carbono. Neste trabalho foram avaliadas a influência de diferentes fontes de fosfato (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) e nitrogênio (NH_4NO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, uréia, peptona, extrato de levedura e milhocina[®]) na produção de lipase por *B. ribis* EC-01, utilizando-se óleo de soja (1,0%, v/v) como fonte única de carbono. As fontes de nitrogênio e fosfato que mais influenciaram a produção de lipase foram NH_4NO_3 e KH_2PO_4 . No planejamento de misturas das fontes de carbono glicerol e óleo de soja, foram avaliados os efeitos de 5 variáveis (pH inicial (X_1), tempo de cultivo (X_2), concentração de NH_4NO_3 (X_3), concentração de KH_2PO_4 (X_4) e velocidade de rotação em rpm ($X_5 = X_1 X_2 X_3 X_4$)) na produção da enzima pelo fungo através de delineamento fatorial fracionário (2^{5-1}). O pH inicial do meio e o tempo de cultivo foram os fatores que mais influenciaram na produção de lipase por *B. ribis* EC-01. Uma Condição de mistura adequada de glicerol (3,6%) e óleo de soja (0,8%) foi utilizada no melhoramento da produção da enzima pelo ascomiceto. Para esta nova razão, no planejamento fatorial (2^5) composto central, a maior produção de lipase (413,6 U/mg) foi obtida em 72 h de cultivo, a 120 rpm, com 0,4% (m/v) de NH_4NO_3 , 1,0% (m/v) de KH_2PO_4 e pH inicial 4,5. No nível de 95% de confiança, houve interação das cinco variáveis e os efeitos mais significativos para a produção da lipase foram o pH inicial do meio e sua interação com o tempo de cultivo. A lipase de *B. ribis* EC-01, produzida em qualquer condição de cultivo, hidrolisou ésteres de *p*-nitrofenila e triacilgliceróis de cadeia curta, média e longa. O óleo de soja produzido em abundância no Brasil é um substrato de baixo custo para a produção de lipases, assim como o glicerol (futuro rejeito da produção do biodiesel). Portanto, o uso destas

⁵ Department of Biochemistry and Biotechnology – BBTEC – State University of Londrina, Londrina – PR, CEP 86051-990, Brazil * Corresponding author: Dr. Aneli de Melo Barbosa E-mail: aneli@uel.br

^b Department of Biological Sciences - State University “Júlio de Mesquita” – UNESP, Assis – SP, Brazil

^c University of Castilla – La Mancha, Regional Institute for Applied Research (IRICA), Ciudad Real, Spain

^d Department of Chemistry –CCE – State University of Londrina, Londrina – PR, CEP – 86051-990, Brazil

fontes de carbono pode ser uma estratégia biotecnológica viável para a obtenção de produtos com maior valor agregado.

Palavras-chave: Lipase. *Botryosphaeria ribis* EC-01. Óleo de soja. Glicerol. Planejamento estatístico de misturas.

1 INTRODUÇÃO

As lipases (EC 3.1.1.3) são encontradas em muitas espécies de animais, plantas e microrganismos [1, 2] e suas propriedades variam conforme sua procedência [1]. Catalisam a hidrólise de ligações do tipo éster em triacilgliceróis de cadeia longa e agem numa interface entre uma fase com substrato insolúvel e uma fase aquosa na qual a enzima está dissolvida [3]. A reação de hidrólise é reversível e a diminuição da água no meio reacional está, geralmente, associada à presença de solventes orgânicos, o que denota a versatilidade destas enzimas em catalisar reações de esterificação e transesterificação, interesterificação, alcóolise, acidólise, dentre outras [2, 4, 5, 6]. As lipases fúngicas possuem aplicações industriais variadas e novos processos biotecnológicos podem ser desenvolvidos com estas enzimas [7], visto que podem ser facilmente separadas do meio micelial por filtração ou centrifugação [8].

Fungos da família *Botryosphaeriaceae* são endofíticos, estão entre os mais agressivos desta comunidade [9] e a habilidade de colonização está associada à produção de enzimas extracelulares [10, 11, 12]. O ascomiceto *Botryosphaeria ribis* é fitopatógeno de oliveira [13], de eucalipto (*B. ribis* EC-01 [14]) e produz pectinases e β -D (1,3)-glucanases [14]. Recentemente foi descrito como produtor de lipases em diferentes fontes de carbono (óleos vegetais, detergentes, ácido graxos, triacilgliceróis, glicerol e carboidratos). A lipase deste microrganismo produzida em óleo de soja (1,0%, v/v) mostrou pH e temperatura ótimos 8,0 e 55 °C, respectivamente, e foi altamente estável na presença de solventes orgânicos como metanol, etanol e glicerol (50,0%, v/v) [15].

A produção de lipase depende da composição do meio de fermentação [16]. A viabilidade de produção, em escala industrial, depende não somente de um microrganismo produtor de lipase, com propriedades catalíticas viáveis para aplicação, como também dos fatores nutricionais para o seu desenvolvimento, como substrato de baixo custo associado a um curto período de produção. O óleo de soja, por exemplo, é uma fonte de carbono acessível, assim como o glicerol que constitui um resíduo da indústria de biodiesel [17].

Considerando-se as propriedades catalíticas da lipase do *B. ribis* EC-01 [15], as quais poderão viabilizar sua aplicação em novos processos biotecnológicos, o objetivo deste trabalho foi selecionar as fontes de nitrogênio (orgânica ou inorgânica), e também de fosfato, que favoreceram a produção desta lipase. Planejamento estatístico de misturas também foi utilizado, para avaliar a concentração de glicerol e óleo de soja comercial, com cinco variáveis independentes (utilizadas no delineamento fatorial), ou seja, tempo de cultivo, pH inicial do meio, concentração de NH_4NO_3 , concentração de KH_2PO_4 e velocidade de agitação; visando melhorar a produção da enzima por *B. ribis* EC-01.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Os ésteres de *p*-nitrofenila e os triacilgliceróis (tributirina, tricaprilina e trioleína) utilizados neste trabalho foram da Sigma-Aldrich. O marcador de massa molecular foi o BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder da Invitrogen. O óleo de soja utilizado foi de grau alimentício e os demais reagentes foram de grau analítico. A milhocina® foi gentilmente doada pela CornProducts Brasil (Mogi Guaçu –SP).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Microrganismo, Meio de Crescimento e Inóculo

Botryosphaeria ribis EC-01 foi isolado do tronco de *Eucalyptus citriodora* e gentilmente doado pelo Dr T. L Krugner do Depto. de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, Brazil. O microrganismo foi mantido em meio inclinado ágar-batata-dextrosado (BDA), a $4,0 \pm 2$ °C e repicado trimestralmente. Para o preparo do inóculo, o fungo foi transferido para placas de Petri contendo meio VGA (Meio mínimo de sais de Vogel [18], glucose 1,0% e Agar 2,0% (m/v)). As placas foram incubadas por cinco dias a 28 ± 2 °C e quatro esferas de 0,7 cm de diâmetro do ascomiceto foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio mínimo de Vogel e óleo de soja (1,0%, v/v) como fonte de carbono. Os cultivos foram mantidos sob agitação a 180 rpm, 28 ± 2 °C, conforme previamente descrito por Dekker; Barbosa [19].

2.2.2 Efeito das Fontes de Nitrogênio, Fosfato e Influência do pH Inicial do meio de Cultivo na Produção de Lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01

Os cultivos foram desenvolvidos nas condições do item anterior, substituindo-se a fonte de nitrogênio NH_4NO_3 (0,2%, m/v) do meio de Vogel [18] por sais inorgânicos (NaNO_3 , NH_4Cl (0,4%, m/v) ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,2%, m/v)) ou por fontes orgânicas como uréia, peptona, extrato de levedura e milhocina[®] (0,2%, m/v). Para avaliar o efeito de diferentes fontes de fosfato na produção da lipase, substituiu-se a fonte de KH_2PO_4 (0,5%, m/v) do meio de Vogel [18] por Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Os cultivos foram realizados em três replicatas.

As melhores fontes de fosfato foram estudadas através de uma curva de crescimento (24 a 120 h) do *B. ribis* EC-01 e a produção de lipase foi acompanhada a cada 24 h. Em um experimento de 120 h, os valores de pH inicial dos meios de cultivos foram ajustados no intervalo de 3,5 a 9,5 com HCl 1,0 mol/L e NaOH 1,0 mol/L. Os cultivos foram realizados em duas replicatas.

2.2.3 Interrupção dos Cultivos e Determinação da Biomassa Fúngica

Os cultivos submersos foram interrompidos à temperatura ambiente, através de centrifugação por 15 min a 1509 xg. A lipase presente no sobrenadante (SL) foi filtrada em lâ de vidro, coletada em banho de gelo e reservada para as determinações analíticas. O micélio foi lavado uma vez com água destilada e determinado gravimetricamente (70 °C até peso constante).

2.2.4 Melhoramento da Produção de Lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em Óleo de Soja e Glicerol por Planejamento Estatístico de Misturas

Em virtude das várias fontes de carbono estudadas para a produção de lipases por *B. ribis* EC-01 [15], optou-se por melhorar a produção da enzima, utilizando-se pelo menos duas fontes de carbono de baixo custo e acessíveis. O glicerol (x_1) (grau analítico), visando futuras aplicações de glicerol residual (da produção do biodiesel) para obtenção de lipases e o óleo de soja comercial (x_2) foram escolhidos. A Tabela 1 mostra as misturas ($x_1;x_2$) (Condição $A_{(1;0)}$, $B_{(0,75;0,25)}$, $C_{(0,5;0,5)}$, $D_{(0,25;0,75)}$ e $E_{(0;1)}$) destas duas fontes de carbono que foram confrontadas com cinco diferentes variáveis: pH inicial do meio (X_1),

tempo de cultivo (X_2), concentração de NH_4NO_3 (% m/v) (X_3), concentração de KH_2PO_4 (% m/v) (X_4) (selecionadas neste estudo) e velocidade de rotação (rpm) (X_5), através de planejamentos fatoriais fracionários 2^{5-1} , sendo $X_5 = X_1X_2X_3X_4$. Os respectivos níveis de variação são mostrados na Tabela 2. Três pontos centrais foram adicionados em cada planejamento. Para os cálculos, foram utilizados os programas STATISTICA (Versão 5.1 – StatSoft Inc.) e o programa fatorial desenvolvido por Barros Neto, Scarminio; Bruns [20].

Dentre as respostas observadas para os cinco delineamentos fracionários (pH final, atividade de lipase (U/mL), biomassa fúngica (g/L) (dados não mostrados)), considerou-se, para a seqüência da análise fatorial, somente a atividade específica da lipase (U/mg). A mistura adequada de glicerol e óleo de soja (Condição F) escolhida para a produção da enzima por *B. ribis* EC-01 foi determinada através da equação $y = b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2$ [21], sendo b_1 a resposta do componente puro x_1 (glicerol), b_2 a resposta do componente puro x_2 (óleo de soja) e x_1 e x_2 representando os novos valores da concentração do glicerol e do óleo de soja, para o valor previsto (y) da atividade de lipase (U/mg). Estabelecida a nova mistura das fontes glicerol e óleo de soja, as variáveis da etapa anterior foram novamente avaliadas através de um planejamento fatorial completo, para cinco fatores em dois níveis (2^5). Foram adicionados ao delineamento três pontos centrais e também 10 pontos axiais, totalizando 45 experimentos (Tabela 3). Todos os testes estatísticos e os efeitos foram calculados no nível de 95% de confiança ($\alpha = 5\%$).

Além das respostas obtidas para os seis delineamentos (fracionário e completo), foram também verificadas as razões C/N, C/P, N/P (calculadas em relação ao carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) total do meio de cultivo (g/25 mL de meio)) para as melhores atividades de lipase (U/mg) obtidas.

2.2.5 Padrões Eletroforéticos em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) e Zimograma de Lipase Presente no Sobrenadante de Diferentes Cultivos

As eletroforeses em géis de poliacrilamida contendo SDS (dodecil sulfato de sódio) foram desenvolvidas de acordo com Laemmli [22]. A lipase presente no sobrenadante (SL) de diferentes cultivos foi dialisada em água deionizada, diluída em tampão de amostra [15], sendo aplicado em cada canaleta 1,5 μg de proteína (presente na SL). Os géis foram preparados com 12,0% (m/v) de poliacrilamida. A corrida eletroforética foi realizada a 100 V e 50 mA. Depois da eletroforese, revelou-se a atividade de lipase [23, 24, 25] e neste caso as amostras aplicadas não foram previamente aquecidas a 100 °C. O tampão utilizado foi

o fosfato de sódio 0,05 mol/L (pH 8,0) e o substrato foi o butirato de metil-umberiferila (MUF-butilato). As bandas com atividade foram visíveis após iluminação UV a 302 nm, exibindo um azul claro fluorescente. Outro gel foi corado com nitrato de prata [26] para revelação das bandas protéicas (amostras previamente aquecidas a 100 °C). Foi utilizado como marcador de massa molecular o BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder da Invitrogen (10 bandas compreendidas entre 181,8 e 6,0 kDa).

2.2.6 Determinação da Atividade Lipolítica

O método do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) foi usado como padrão para determinar a atividade lipolítica [27]. A reação foi realizada em tampão fosfato de sódio 0,05 mol/L, pH 8,0 e a 55 °C [15]. A absorvância medida foi lida a 410 nm (espectrofotômetro SHIMADZU, UV-1240) e o coeficiente de extinção do *p*-nitrofenol (*p*NP) utilizado foi $1,5 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [28]. Para a determinação da especificidade da SL obtida de diferentes cultivos (amostras previamente dialisadas em água deionizada), ésteres de *p*-nitrofenila (acetato, butirato, caproato, caprato e estearato) foram utilizados nas mesmas condições de reação acima descritas, como também diferentes triacilgliceróis (trioleína, tricaprilina e tributirina) e óleo de soja comercial, através do método titulométrico, sendo que uma emulsão contendo 7,0% de triacilglicerol ou óleo de soja comercial e 4,5% de Triton X-100 em tampão fosfato de sódio 0,05 mol/L (pH 8,0) foi incubada com 0,5 mL de cada SL e titulada com NaOH 0,05 mol/L, através de um titulador potenciométrico Metrohm (modelo 842 – Titrand) do tipo pH STAT, durante 5 min e a 55 °C (baseado em STUER e colaboradores [29]). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1 μmol de *p*-NP ou ácido graxo por minuto da solução de enzima.

2.2.7 Determinações Analíticas

A concentração de proteínas extracelulares foi determinada através do método de Lowry e colaboradores [30] e de acordo com Hartree [31], sendo a albumina bovina utilizada como padrão. Os açúcares totais foram determinados de acordo com Dubois e colaboradores [32] e os açúcares redutores foram determinados segundo o método de Somogyi [33] e Nelson [34]. Glucose foi utilizada como padrão tanto para as dosagens de açúcar redutor quanto de açúcar total.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO

O fungo *B. ribis* EC-01 é produtor constitutivo e indutivo de lipases. Nas fontes indutivas (óleo de soja, Tween 80, ácido oléico, trioleína e glicerol), a produção da enzima variou dependendo da fonte de carbono utilizada no meio de cultivo [15].

Neste trabalho foram avaliadas as fontes de nitrogênio uréia, milhocina[®], extrato de levedura, peptona, NH_4NO_3 ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,2% e NaNO_3 ou NH_4Cl a 0,4% (m/v) na produção de lipase pelo *B. ribis* EC-01. Para todos os cultivos, a fonte de carbono foi o óleo de soja (1,0%, v/v) e a fonte de fosfato, KH_2PO_4 (0,5%, m/v). As maiores atividades (32,2 U/mL e 89,3 U/mg) foram obtidas nos cultivos que continham 0,2% (m/v) de NH_4NO_3 (Figura 1a). Geralmente, os microrganismos produzem maiores níveis de lipase em fontes orgânicas de nitrogênio [1]. Um *Aspergillus* sp., por exemplo, produziu duas vezes mais lipase (14,8 U/mL) no meio de cultivo com peptona do que com NH_4NO_3 (7,50 U/mL) [35]. A produção de lipase intracelular por *Rhizopus oryzae* foi maior com água de maceração de milho (7,0%, m/v) [7]. Entretanto, para *Aureobasidium pullulans* HN2.3, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,6%, m/v) proporcionou a produção de 8,0 U/mL [36]. Em relação ao gênero *Botryosphaeria*, fontes inorgânicas de nitrogênio, tais como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NH_4NO_3 têm sido descritas como preferenciais para a produção de lacases por *B. rhodina* MAMB-05 [37], enquanto que para a produção de lipases, maior atividade específica foi obtida nos cultivos com NH_4NO_3 , visto que não existiam informações anteriores às deste trabalho.

Os valores de pH final dos diferentes cultivos variaram entre 5,0 e 7,0, com exceção dos meios que continham NH_4Cl como fonte de nitrogênio (pH final 1,8). O NH_4^+ é o íon mais facilmente assimilável entre as formas inorgânicas de nitrogênio, visto que o átomo de nitrogênio está no mesmo grau de oxidação (-3) que o átomo de nitrogênio das moléculas biológicas (aminoácidos, purinas e pirimidinas). Considerando-se que o NH_4^+ é um ácido fraco, ele dissocia-se no meio de fermentação em NH_3 e H^+ . Por difusão passiva a amônia entra na célula, diferentemente de nitratos, que necessitam das enzimas nitrato e nitrito redutase (ambas dependentes de NADPH) para a sua conversão em NH_3 . Provavelmente esta seja a explicação para o pH final ter atingido um valor tão baixo, ou seja, o NH_3 foi rapidamente utilizado pelo microrganismo, sendo retirado do meio de cultivo, restando os íons H^+ e Cl^- [38, 39].

Houve baixa produção de lipase na presença das fontes orgânicas de nitrogênio extrato de levedura (1,9 U/mL) e peptona (15,4 U/mL), assim como na inorgânica NaNO_3 (4,5 U/mL). Apesar das baixas atividades de lipase obtidas, houve crescimento do ascomiceto, visto que as produções de biomassa foram próximas, 11,51 g/L, 13,08 g/L, e 12,18 g/L, respectivamente, se comparadas com a do meio que continha NH_4NO_3 (12,26 g/L), a qual proporcionou maior atividade de lipase (Figura 1a).

Depois de cinco dias de cultivo, o açúcar total presente nas fontes de nitrogênio milhocina® (1,41 g/L), extrato de levedura (0,93 g/L) e peptona (0,46 g/L) foi consumido em cerca de 2, 18 e 32%, respectivamente. Dentre os açúcares redutores presentes nestas fontes de nitrogênio, no início do cultivo, houve um aumento destes cerca de 10 vezes no final do cultivo. Portanto, *B. ribis* EC-01 utilizou principalmente o óleo de soja (10 mL/L) como fonte de carbono para seu desenvolvimento e produção de lipase, considerando-se os açúcares residuais presentes no final destes cultivos.

3.2 EFEITO DA FONTE DE FOSFATO E DO pH INICIAL NA PRODUÇÃO DE LIPASE POR *BOTRYOSPHERIA RIBIS* EC-01

Os maiores níveis de produção de lipase por *B. ribis* EC-01 ocorreram nos cultivos com K_2HPO_4 (0,5%, m/v). O crescimento fúngico (g/L) foi maior na presença de KH_2PO_4 , seguido pelo K_2HPO_4 . Os valores de pH final dos cultivos que continham Na_2HPO_4 e K_2HPO_4 foram alcalinos (entre 8,0 e 8,7), enquanto que os dos cultivos com $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ foram ácidos (pH 3,8), provavelmente, pela assimilação mais rápida do NH_4^+ pelo microrganismo [38, 39] (Figura 1b).

As fontes de fosfato K_2HPO_4 e KH_2PO_4 têm sido utilizadas rotineiramente na produção de lipases por fungos [28, 40, 41, 42, 43]. A Figura 2a mostra o perfil de produção de lipase por *B. ribis* EC-01 durante 120 h, em ambas as fontes de fosfato, sem controle do pH inicial. Observou-se que os maiores níveis e o platô de produção da enzima, em atividade específica (278 a 285 U/mg) foram obtidos em 96 h, na presença de K_2HPO_4 , durante a fase estacionária de crescimento (Figura 2b). O pH do cultivo variou entre 7,2 (inicial) e 8,0 (final). A atividade de lipase nesta fonte aumentou significativamente após 48 h de cultivo. Embora na presença do KH_2PO_4 , *B. ribis* EC-01 tenha produzido menos lipase que na fonte de fosfato anterior (Figura 2a), o pico de produção (166,4 U/mg) foi atingido na fase exponencial de crescimento (72 h), e em 24 h de cultivo foram detectadas 66,3 U/mg de atividade lipolítica (Figura 2c). Nos cultivos com KH_2PO_4 , o pH inicial foi 5,8 e o final 6,8.

Estes resultados sugerem que não somente a fonte de fosfato interfere na produção de lipase, como também o pH inicial de cultivo. De acordo com Jaeger e colaboradores [44], o pH do cultivo pode estar associado ao aumento da produção de lipase e valores de pH entre 7,0 e 8,0 favorecem a sua síntese. Isto foi observado na produção de lipase por um *Aspergillus oryzae*, quando foram estudados os melhores valores de pH inicial do cultivo. O melhor pH inicial foi pH 6,0 enquanto que o pico máximo de produção da lipase foi obtido quando o pH atingiu 8,0 [45].

A influência do pH inicial de cultivo de 3,5 a 9,5 na produção de lipase pelo *B. ribis* EC-01, durante 120 h, nas fontes de fosfato K_2HPO_4 e KH_2PO_4 está apresentada na Figura 2d. O maior nível de produção de lipase (632,6 U/mg) foi obtido com KH_2PO_4 , quando o pH inicial foi 8,5. Portanto, o pH inicial afeta a síntese de lipase e esta fonte de fosfato foi selecionada para experimentos posteriores.

A produção de lipase por *Fusarium globulosum* foi avaliada na faixa de pH inicial entre 3,0 e 10,0 e a atividade máxima (15 U/mL) foi obtida a pH 7,0 em 96 h de cultivo [46], enquanto que para uma *Candida* sp., o melhor pH inicial foi entre 5,8 e 7,0, também em 96 h de cultivo e a produção obtida foi 4200 U/mL [47]. Para um *Aspergillus terreus*, o pH inicial de cultivo foi avaliado entre 3,0 e 10,0 e a maior produção da enzima (7,8 U/mL) foi em de óleo de milho (2,0%, v/v), no pH inicial 9,0 em 96 h a 37°C [41]. Já *Cryptococcus* sp. S-2 produziu maior atividade de lipase (64,5 U/mL), em trioleína 1,0% (m/v) e extrato de levedura, no pH inicial 5,6 em 120 h [48]. Conseqüentemente, o pH inicial de cultivo afeta a produção de lipase, porém a faixa ótima ou o pH ótimo de produção não pode ser generalizado, isto porque a composição do meio de cultivo (fontes de carbono, nitrogênio, fosfato, concentração de inóculo), além das condições de cultivo (agitação, temperatura, relação ar: meio) certamente também poderão exercer efeito interativo.

3.3 PRODUÇÃO DE LIPASE POR *BOTRYOSPHERIA RIBIS* EC-01 COM O AUXÍLIO DA ANÁLISE FATORIAL

Quando o objetivo é melhorar as condições de cultivo para produzir qualquer metabólito microbiano, uma das dificuldades encontradas é a existência de efeitos de interação dos componentes do meio [49]. Esta interação pode ser detectada através de planejamento fatorial, e este constitui também uma ferramenta que proporciona o melhoramento da produção dos metabólitos.

3.3.1 Planejamento de Misturas

A adição de concentrações crescentes de óleo vegetal ao meio de cultivo pode interferir na transferência de oxigênio para o microrganismo, alterando o metabolismo e a síntese de lipase [50]. Os mecanismos de biossíntese desta enzima variam de microrganismo para microrganismo e conforme a composição do meio [51].

O glicerol (x_1) e o óleo de soja (x_2) foram previamente selecionados como boas fontes de carbono para a produção de lipase por *B. ribis* EC-01 [15]. Neste trabalho, foram desenvolvidos planejamentos de misturas, visando melhorar a produção de lipase por este fungo (U/mg). Tanto a ausência do óleo (Condição A_(1,0)), ou sua mistura com glicerol (Condição B_(0,75;0,25), C_(0,5;0,5) e D_(0,25;0,75)), ou ainda a ausência de glicerol (Condição E_(0,1)), influenciaram na significância das variáveis independentes e de suas interações (Tabela 2).

A lipase pode ser produzida em diferentes fontes de carbono podendo ou não ser regulada por glucose. Por exemplo, a levedura *Issatchenkia orientalis* produziu lipase em glucose (80 U/mL) e em glicerol (25 U/mL), como fontes de carbono (2,0%, m/v), após 144 h de incubação a 30°C [52]. Já *Penicillium aurantiogriseum* não produziu lipase em glucose como fonte de carbono e a enzima foi induzida por óleo de oliva [28]. A síntese de lipase por *B. ribis* EC-01 não é regulada por glicose e esta enzima pode ser produzida em várias fontes de carbono [15].

Para as Condições de mistura A e E foram considerados no tratamento estatístico (Statistica 5.1) os 21 experimentos dos respectivos planejamentos fracionários. Para B, C e D, os valores da atividade de lipase (U/mg), respostas de 16 experimentos de cada condição de mistura, foram submetidos ao programa estatístico desenvolvido por Barros Neto; Scarminio; Bruns [20].

Foi possível obter equações de regressão somente para as Condições A e E, que deram origem às superfícies de resposta (gráficos de contorno) (Figura 3). Para B, C e D, os resultados das estimativas dos efeitos para as variáveis X_1 , X_2 , X_3 , X_4 e $X_5=(X_1X_2X_3X_4)$, aliados ao gráfico padrão das estimativas, revelaram quais foram os fatores e suas interações mais influentes na melhora da produção de lipase (U/mg) por *B. ribis* EC-01.

Para a Condição de mistura A (ausência de óleo e de soja e 6,0% (m/v) de glicerol), os coeficientes de regressão e seus respectivos valores de erro padrão (estatisticamente significativos no nível de 95%) apresentados na Equação 1, mostraram que principalmente o tempo de cultivo (X_2), seguido do pH inicial do meio (X_1) influenciaram na melhora da produção da enzima (U/mg). A interação do pH inicial do meio com a fonte de

fosfato (X_1X_4) também foi importante. Os termos em negrito representam as variáveis significativas. Pelo diagrama de superfície de resposta (gráfico de contorno) obtido para a Condição de mistura A, observou-se uma tendência para a condição ótima da produção de lipase que foi obtida em níveis superiores do tempo de cultivo e inferiores do pH inicial do meio (Figura 3), no perfil de interação “Tempo de cultivo x pH inicial do meio”.

$$\hat{y} = 22,22 - 9,49X_1 + 16,82X_2 - 3,11X_3 + 2,56X_4 - 5,62X_1X_2 - 5,56X_1X_3 - 7,03X_1X_4 - 0,96X_2X_3 + 4,12X_2X_4 + 3,42X_3X_4$$

$(\pm 2,54)$ $(\pm 2,75)$ $(\pm 2,92)$ $(\pm 2,91)$ $(\pm 2,91)$ $(\pm 2,91)$ $(\pm 2,91)$ $(\pm 2,91)$ $(\pm 2,91)$ $(\pm 2,91)$ $(\pm 2,91)$

Equação 1

Conforme foi discutido previamente no item 3.2, o pH do meio de cultivo pode estar relacionado com o aumento da produção de lipase [44]. Na Condição B (glicerol 4,5% (m/v) e óleo de soja 0,5% (v/v)), Condição C (glicerol 3,0% (m/v) e óleo de soja 1,0% (v/v)) e Condição D (glicerol 1,5% (m/v) e óleo de soja 1,5% (v/v)) através do gráfico normal das estimativas (Figura 4), foi possível observar que o pH inicial do meio (X_1), quando mais ácido, contribuiu enormemente na melhora da produção da enzima. Nas três condições de misturas descritas acima, o efeito positivo do tempo de cultivo (X_2) foi a variável mais significativa (Figura 4).

Na Condição de mistura B, os efeitos de interação do pH inicial (X_1) com as fontes de nitrogênio (X_3) e fosfato (X_4), e de interação da fonte de nitrogênio (X_3) com o fosfato (X_4), foram importantes para o modelo (Figura 4).

Para a Condição C, além da interação da fonte de nitrogênio (X_3) com a de fosfato (X_4) ser significativa, o efeito de interação do tempo de cultivo (X_2) com as mesmas fontes nutricionais (X_3) e (X_4), também influenciou nas respostas de atividade de lipase produzida por *B. ribis* EC-01 (Figura 4).

O efeito de interação entre o pH inicial do meio (X_1), tempo de cultivo (X_2) e fonte de nitrogênio (X_3) foi significativo na produção da enzima pelo fungo (Condição de mistura D) e a interação das 4 variáveis (pH inicial do meio (X_1) com o tempo de cultivo (X_2), fonte de nitrogênio (X_3) e fosfato (X_4)), também foi importante (Condições de mistura B e D) (Figura 4). Vale ressaltar que a variável X_5 (velocidade de rotação (rpm)) é igual a interação de $X_1X_2X_3X_4$, e, portanto, seu efeito positivo também foi significativo na produção de lipase por *B. ribis* EC-01.

A velocidade de agitação dos cultivos constitui uma variável importante para a produção de lipase, como observado para a levedura *Yarrowia lipolytica*, cultivada em diferentes agitações (100, 200, 300, 400 rpm). Nos cultivos mantidos a 100 rpm houve menor crescimento celular e menor produção da enzima (0,96 U/mL), enquanto que a 200 rpm houve maior produção de biomassa e de lipase (4,68 U/mL) [53]. Esta variável foi avaliada separadamente e não através de um planejamento fatorial, não sendo possível avaliar sua interação com outros fatores estudados.

A Equação 2, exibe as variáveis significativas em negrito. Tanto o efeito negativo do pH inicial do meio (X_1) quanto o efeito positivo do tempo de cultivo (X_2), influenciaram nas respostas de atividade de lipase (U/mg) na Condição de mistura E (ausência de glicerol e 2,0% (v/v) de óleo de soja).

$$\hat{y} = 88,74 - 64,11X_1 + 34,96X_2$$

(±8,07) (±8,72) (±9,25)

Equação 2

Pelo gráfico de contorno obtido para a Condição de mistura E, observou-se uma região de máximo, para níveis superiores do tempo de cultivo e inferiores de pH inicial do meio (Figura 3), no perfil de interação “Tempo de cultivo x pH inicial do meio”.

3.3.2 Planejamento Fatorial (2^5) Composto Central

Através da equação \hat{y} (U/mg) = $81,56x_1 + 229,55x_2 + 786,74x_1 \cdot x_2$, obteve-se um valor calculado da atividade de lipase [20] em relação a uma mistura adequada de glicerol e óleo de soja (após análise das 5 Condições de misturas), ou seja, $x_1=3,56\%$ (m/v) de glicerol e $x_2=0,82\%$ (v/v) de óleo de soja para um \hat{y} (U/mg) = 331,45 (Condição F).

O planejamento fatorial 2^5 composto central proporcionou atividade de lipase de 413,61 U/mg em apenas 72 h de cultivo, a 120 rpm e com pH inicial de 4,5. As concentrações de NH_4NO_3 e KH_2PO_4 utilizadas no cultivo foram 0,4% e 1,0% (m/v), respectivamente (experimento nº 13 da Tabela 3).

Para a produção de lipases fúngicas, normalmente necessita-se de uma maior concentração de nitrogênio no meio de cultivo do que para a obtenção de outras

enzimas [50] e no caso desta produção de lipase pelo *B. ribis* EC-01, foram requeridas maiores concentrações tanto de nitrogênio quanto de fosfato.

A Equação 3 foi obtida através de um programa estatístico [20], no qual foram incluídos 32 experimentos (níveis -1 e +1) na modelagem e mostra os efeitos e suas interações significativas no nível de 95%.

$$\hat{y} = 80,12 - 36,26X_1 + 11,71X_3 + 20,27X_4 + 16,03X_5 + 34,0X_1X_2 - 21,60X_1X_3 - 9,31X_2X_3 - 25,37X_1X_4 - 17,35X_2X_4 + 14,86X_1X_5 + 11,59X_2X_5 - 8,65X_3X_5 - 7,10X_4X_5 + 6,88X_1X_2X_3 + 6,48X_1X_2X_4 + 14,66X_1X_2X_5 + 8,29X_1X_3X_5 + 28,17X_2X_3X_5 - 7,07X_1X_4X_5 - 6,57X_2X_4X_5 - 9,4X_3X_4X_5 + 6,18X_1X_2X_3X_4 - 23,91X_1X_2X_3X_5 - 11,22X_1X_2X_4X_5 + 21,01X_1X_3X_4X_5 + 25,13X_2X_3X_4X_5 - 9,66X_1X_2X_3X_4X_5$$

Equação 3

A equação acima mostra a interação entre todas as variáveis estudadas ($X_1X_2X_3X_4X_5$), sendo o pH inicial (X_1) e sua interação com o tempo de cultivo (X_1X_2) os efeitos mais destacáveis (em negrito).

As melhores atividades de lipase de *B. ribis* EC-01 encontradas tanto no planejamento de misturas quanto neste delineamento fatorial (2^5) composto central, mostraram que o efeito negativo do pH inicial do meio de cultivo foi demasiado importante para os modelos estatísticos. O pH final do cultivo variou entre 3,3-5,6 (dados não mostrados para as 5 Condições de misturas (A, B, C, D e E)).

Teng e Xu [49] estudaram diversas variáveis na produção de lipase por *Rhizopus chinensis*. As variáveis fontes de nitrogênio (extrato de malte e peptona), concentração de óleo de oliva, K_2HPO_4 , agitação, quantidade de inóculo, pH inicial e volume da fermentação do meio foram os fatores mais influentes na produção desta lipase.

Em um delineamento fatorial 2^5 desenvolvido para a produção de lipase por *Candida cylindracea*, houve a produção de 17,30 U/mL de lipase em glucose, como única fonte de carbono e 47,25 U/mL em óleo de oliva. Dentre as variáveis que mais influenciaram a produção de lipase em óleo de oliva, estava o próprio óleo, sua interação com extrato de levedura, sua interação com Tween 80 e o extrato de malte. Nos cultivos com glucose, os fatores mais relevantes, além do próprio carboidrato, foram as suas interações com o Tween 80, com extrato de malte, além do próprio extrato de malte sozinho. O óleo de oliva (3,0 a

3,8%) apresentou um ótimo efeito indutor na produção da lipase por *C. cylindracea* e as duas diferentes fontes de carbono avaliadas influenciaram diferentemente em algumas das interações das variáveis independentes [54].

Embora tenha ocorrido interação entre as 5 variáveis estudadas para a produção de lipase por *B. ribis* EC-01, pode ser observado na Figura 5 o diagrama entre as respostas previstas *versus* respostas originais, que mostra uma boa correlação preditiva do modelo, ou seja, não houve variação sistemática, indicando que este modelo é confiável.

3.4 EFEITO DA RELAÇÃO C/N, C/P E N/P NA PRODUÇÃO DE LIPASE POR *BOTRYOSPHERIA RIBIS* EC-01

Foram calculadas as relações C/N, C/P e N/P para a condição na qual houve maior produção de lipase, em atividade específica (U/mg), de cada delineamento fatorial, ou seja, para as Condições A= 81,5, B= 322,7, C= 352,2, D=239,4, E= 229,5 e F=413,6 (U/mg). Para o experimento 13 da Condição F (Tabela 3) as razões foram: C/N=15,6; C/P=11,3 e N/P=0,7 (Figura 6). Concomitantemente com o planejamento fatorial completo cultivou-se o *B. ribis* EC-01 em pH inicial 4,5 e concentrações de NH_4NO_3 e KH_2PO_4 a 0,4 e 1,0% (m/v), respectivamente, durante 96 h a 180 rpm (dados não mostrados). Comparando-se o experimento 13 da Condição F com esta última, o tempo de cultivo aumentou de 72 para 96 h, a agitação de 120 para 180 rpm e a atividade da lipase subiu de 413, 61 para das 517,8 U/mg, enquanto que as razões C/N, C/P e N/P foram mantidas. A produção de lipase por este fungo em pH inicial 8,5 (Figura 2d) foi 632,6 U/mg, e as relações foram: C/N = 15,3; C/P = 11,2; N/P = 0,7, apesar da fonte de carbono ter sido somente o óleo de soja (1,0%, m/v). Comparando-se estes últimos valores das respectivas razões com as do experimento 13 da Condição F, elas estão muito próximas, o que demonstra que, não somente o pH do meio constitui um fator importante, como também as razões C/N, C/P e N/P têm funções significantes na síntese de lipase pelo *B. ribis* EC-01.

3.5 COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES DE LIPASES DO *BOTRYOSPHERIA RIBIS* EC-01 PARA VÁRIOS SUBSTRATOS, OBTIDAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO E PERFIL ELETROFORÉTICO PARA ATIVIDADE E PROTEÍNAS

A lipase C (LC) foi obtida de cultivos do *B. ribis* EC-01 no meio mínimo de Vogel [18] contendo óleo de soja a 1 % (v/v), durante 120 h a 28 °C e 180 rpm, sem controle do pH e com pH inicial entre 5,8 a 6,0 (Condição padrão) [15]. A lipase 1 (L1) foi obtida nas mesmas condições da lipase C, excetuando-se o pH inicial de 8,5 (Figura 2d). A lipase 2 (L2) foi obtida de acordo com o experimento 20 da Condição F (Tabela 3), ou seja, nas mesmas condições de cultivo da lipase 1, substituindo-se a fonte de carbono por glicerol 3,6% (m/v) e óleo de soja 0,8% (v/v), enquanto que a lipase 3 (L3) foi obtida através do experimento 13 da Condição F (glicerol 3,6% (m/v) e óleo de soja 0,8% (v/v), 72 h de cultivo a 28 °C e 120 rpm, pH inicial 4,5 e concentrações de NH_4NO_3 e KH_2PO_4 a 0,4% e 1,0% (m/v), respectivamente).

As porcentagens de atividade destas quatro lipases obtidas nas condições descritas acima, em diferentes substratos, ou seja, ésteres de *p*-nitrofenila com ácidos graxos de cadeia carbônica de diferentes tamanhos, óleo de soja e triacilgliceróis, estão apresentados na Tabela 4. Todas as lipases hidrolisaram os substratos avaliados. A lipase L1 foi a que apresentou maior atividade quando hidrolisou o *p*NPP ou o óleo de soja, que corresponderam a 100 % de atividade para os cálculos apresentados na referida Tabela. Esta enzima também foi a que se destacou apresentando maior atividade para todos os substratos estudados, com exceção da trioleína. Embora as atividades das lipases para hidrolisar a trioleína tenham sido as mais baixas, dentre os triacilgliceróis avaliados, a habilidade destas enzimas em hidrolisá-la permite afirmar que estas são lipases verdadeiras [55].

O perfil eletroforético das lipases foi revelado com MUF-butirato e para proteínas (corado com nitrato de prata). As lipases LC, L1 e L2 mostraram bandas de atividade entre 12 e 16 kDa e entre 45 e 80 kDa, enquanto que a L3 não hidrolizou o MUF-butirato. Estes valores de massa molecular estão de acordo com as descritas para lipases microbianas [3, 56, 57].

Tabela 1 – Misturas das fontes de carbono glicerol (% m/v) e óleo de soja (% v/v) para a produção de lipase por *B. ribis* EC-01 utilizadas em cada planejamento fatorial fracionário (2^{5-1}).

Fontes de carbono	Condição A ($x_1;x_2$) = (1;0)	Condição B ($x_1;x_2$) = (0,75;0,25)	Condição C ($x_1;x_2$) = (0,50;0,50)	Condição D ($x_1;x_2$) = (0,25;0,75)	Condição E ($x_1;x_2$) = (0;1)
x_1 - Glicerol % (m/v)	6,0	4,5	3,0	1,5	0
x_2 - Óleo de Soja % (v/v)	0	0,5	1,0	1,5	2,0

Tabela 2 – Resposta da atividade específica (U/mg) de lipase produzida por *B. ribis* EC-01 para cada planejamento fatorial fracionário (2^{5-1}) das condições de misturas das fontes de carbono glicerol e óleo de soja (A, B, C, D e E)

Nº do Experimento						Atividade de Lipase (U/mg)				
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	Condição A	Condição B	Condição C	Condição D	Condição E
1	-1	-1	-1	-1	+1	7,83	110,45	61,77	83,17	119,19
2	+1	-1	-1	-1	-1	15,55	0,21	0,82	1,78	0,87
3	-1	+1	-1	-1	-1	33,70	136,52	352,22	131,09	159,53
4	+1	+1	-1	-1	+1	54,11	219,04	241,45	178,23	90,71
5	-1	-1	+1	-1	-1	10,80	20,41	40,14	80,31	76,80
6	+1	-1	+1	-1	+1	0,08	1,05	1,25	1,88	1,88
7	-1	+1	+1	-1	+1	39,01	322,73	139,63	239,37	229,55
8	+1	+1	+1	-1	-1	9,00	0,47	0,95	1,93	1,56
9	-1	-1	-1	+1	-1	13,18	0,22	46,40	57,79	53,56
10	+1	-1	-1	+1	+1	0,06	0,29	1,17	0,87	0,94
11	-1	+1	-1	+1	+1	65,23	197,33	125,29	112,16	132,00
12	+1	+1	-1	+1	-1	25,82	0,42	8,37	15,74	0,444
13	-1	-1	+1	+1	+1	8,17	71,56	58,76	77,97	119,24
14	+1	-1	+1	+1	-1	0,35	39,09	0,49	1,03	0,24
15	-1	+1	+1	+1	-1	81,52	216,82	269,23	44,24	226,11
16	+1	+1	+1	+1	+1	16,72	1,04	5,96	107,26	92,18
17 ^a	0	0	0	0	0	28,18	201,18	233,77	198,65	115,08
18 ^a	0	0	0	0	0	15,66	262,01	188,04	201,78	125,71
19 ^a	0	0	0	0	0	7,61	146,62	162,61	129,08	89,89
20 ^b	-1	0	0	0	0	33,54	178,93	163,05	153,58	227,46
21 ^b	+1	0	0	0	0	0,44	0,33	0,06	0,48	0,69

Fatores	Valores reais		
	-1	0	+1
X_1 pH inicial	4,5	6,5	8,5
X_2 Tempo de cultivo (h)	72	96	120
X_3 NH_4NO_3 (% m/v)	0,2	0,3	0,4
X_4 KH_2PO_4 (% m/v)	0,5	0,75	1,0
X_5^* Rotação (rpm)	120	180	240

* $X_5 = X_1 X_2 X_3 X_4$

^a ponto central

^b variação dos níveis -1 e +1 somente para o pH inicial do meio de cultivo

Tabela 3 – Respostas para o planejamento fatorial (2^5) composto central de *B. ribis* EC-01 para a condição de mistura F (glicerol (3,6%; m/v) e óleo de soja (0,8%; (v/v))).

Nº do Experimento	Variáveis					Respostas				
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	pH inicial	pH final	Lipase (U/mL)	Lipase (U/mg)	Biomassa (g/L)
1	-1	-1	-1	-1	-1	4,51	5,68	3,92	28,22	6,76
2	+1	-1	-1	-1	-1	8,55	7,12	0,16	2,42	3,00
3	-1	+1	-1	-1	-1	4,49	6,71	40,87	85,50	17,88
4	+1	+1	-1	-1	-1	8,49	7,01	0,50	6,49	8,44
5	-1	-1	+1	-1	-1	4,61	4,32	14,73	117,84	7,16
6	+1	-1	+1	-1	-1	8,48	7,37	0,26	5,78	4,00
7	-1	+1	+1	-1	-1	4,46	4,78	68,53	46,59	18,28
8	+1	+1	+1	-1	-1	8,52	7,98	0,04	0,89	3,20
9	-1	-1	-1	+1	-1	4,52	3,55	12,13	29,09	8,60
10	+1	-1	-1	+1	-1	8,55	6,68	0,82	15,77	10,16
11	-1	+1	-1	+1	-1	4,52	6,31	41,53	116,99	22,64
12	+1	+1	-1	+1	-1	8,46	7,60	35,80	65,33	13,84
13	-1	-1	+1	+1	-1	4,45	3,47	60,80	413,61	14,40
14	+1	-1	+1	+1	-1	8,45	7,82	0,03	1,07	3,36
15	-1	+1	+1	+1	-1	4,49	5,01	18,87	83,87	22,84
16	+1	+1	+1	+1	-1	8,48	6,94	0,42	6,00	7,64
17	-1	-1	-1	-1	+1	4,51	4,63	9,45	53,69	7,16
18	+1	-1	-1	-1	+1	8,55	7,41	0,21	6,00	5,96
19	-1	+1	-1	-1	+1	4,49	5,36	2,49	10,97	10,80
20	+1	+1	-1	-1	+1	8,49	7,86	89,17	231,01	19,32
21	-1	-1	+1	-1	+1	4,61	3,59	23,30	128,02	9,56
22	+1	-1	+1	-1	+1	8,48	7,39	0,17	6,30	3,08
23	-1	+1	+1	-1	+1	4,46	4,63	64,27	95,07	21,28
24	+1	+1	+1	-1	+1	8,52	6,65	29,60	132,74	15,40
25	-1	-1	-1	+1	+1	4,52	6,28	35,30	296,64	15,36
26	+1	-1	-1	+1	+1	8,55	6,77	5,81	49,24	10,28
27	-1	+1	-1	+1	+1	4,52	6,29	24,08	43,39	22,68
28	+1	+1	-1	+1	+1	8,46	7,23	59,67	53,76	13,24
29	-1	-1	+1	+1	+1	4,45	6,27	40,53	144,23	13,36
30	+1	-1	+1	+1	+1	8,45	7,59	0,015	0,625	4,16
31	-1	+1	+1	+1	+1	4,49	4,86	67,67	168,33	22,76
32	+1	+1	+1	+1	+1	8,48	7,66	98,00	118,36	24,04
33 ^a	0	0	0	0	0	6,60	6,50	15,10	27,21	16,20
34 ^a	0	0	0	0	0	6,60	6,43	12,92	35,20	17,68
35 ^a	0	0	0	0	0	6,60	6,38	13,10	33,76	15,48
36 ^b	-2,24	0	0	0	0	2,06	2,22	0,18	3,33	4,72
37 ^b	+2,24	0	0	0	0	10,89	9,29	0,095	0,87	3,80
38 ^b	0	-2,24	0	0	0	6,60	6,26	6,07	63,23	6,40
39 ^b	0	+2,24	0	0	0	6,60	6,77	30,20	45,90	18,64
40 ^b	0	0	-2,24	0	0	6,50	6,86	13,82	47,99	13,80
41 ^b	0	0	+2,24	0	0	6,51	5,19	20,20	36,73	18,52
42 ^b	0	0	0	-2,24	0	6,59	5,04	28,30	105,20	15,12
43 ^b	0	0	0	+2,24	0	6,48	6,39	21,02	67,81	16,48
44 ^b	0	0	0	0	-2,24	6,47	6,50	4,83	39,27	6,36
45 ^b	0	0	0	0	+2,24	6,47	7,13	77,40	155,42	20,24

Fatores	Valores reais				
	-2,24	-1	0	+1	+2,24
X_1 pH inicial	2,028	4,5	6,5	8,5	10,97
X_2 Tempo de cultivo (h)	42,34	72	96	120	149,67
X_3 NH_4NO_3 (% m/v)	0,076	0,2	0,3	0,4	0,52
X_4 KH_2PO_4 (% m/v)	0,191	0,5	0,75	1,0	1,31
X_5 Rotação (rpm)	45,84	120	180	240	314,16

^a ponto central,

^b pontos axiais

Tabela 4 – Comparação das atividades das lipases (%) de *B. ribis* EC-01, para diferentes substratos, obtidas em diferentes condições de cultivo

Lipases de diferentes cultivos	^a Acetato de pNP	^a Butirato de pNP	^a Caproato de pNP	^a Caprato de pNP	^a Palmitato de pNP	^a Estearato de pNP	^b Óleo de soja comercial	^b Trioleína	^b Tricaprilina	^b Tributirina
LC	0,3 ± 0,01	12,1 ± 0,13	11,4 ± 0,16	9,50 ± 0,21	40,4 ± 0,47	28,9 ± 0,09	55,1 ± 0,05	2,9 ± 0,19	18,0 ± 0,25	53,8 ± 0,29
L 1	0,8 ± 0,03	29,9 ± 1,27	32,1 ± 1,15	27,7 ± 1,64	100,0 ± 0,94*	61,4 ± 1,57	100,0 ± 0,07*	12,0 ± 0,30	50,8 ± 0,21	85,0 ± 1,02
L 2	0,6 ± 0,00	27,3 ± 0,06	25,1 ± 1,20	23,1 ± 0,55	77,2 ± 0,46	52,6 ± 0,15	63,8 ± 0,30	7,2 ± 0,06	35,8 ± 0,24	60,9 ± 0,39
L 3	0,1 ± 0,00	10,0 ± 0,55	8,21 ± 0,10	7,04 ± 0,18	36,9 ± 0,40	23,5 ± 0,99	80,3 ± 0,41	29,00 ± 0,67	23,4 ± 0,54	59,9 ± 2,14

Atividade de lipase determinada (**a**) por método colorimétrico, (**b**) por titulometria (pH STAT). As lipases LC, L1, L2 e L3 foram obtidas conforme descrito no item 3.5. (*) Atividade de lipase no pNPP e no óleo de soja foi admitida como 100%.

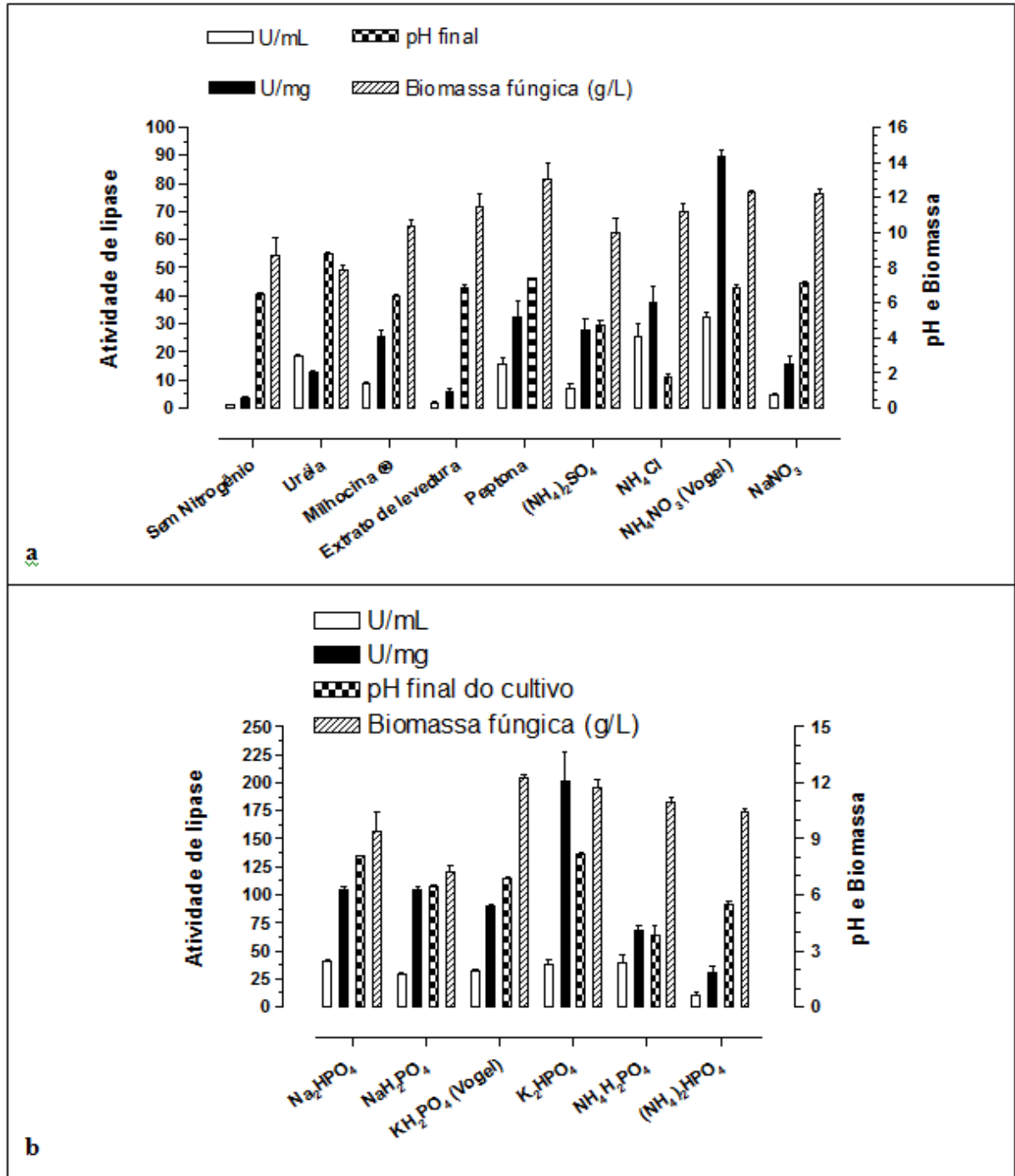


Figura 1 – (a) Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de lipases por *B. ribis* EC-01. As concentrações (m/v) utilizadas foram: 0,2% de uréia, milhocina®, extrato de levedura, peptona, NH₄NO₃ ou (NH₄)₂SO₄ e 0,4% de NaNO₃ ou NH₄Cl. Para todos os cultivos, a fonte de fósforo foi o KH₂PO₄ (0,5%, m/v). (b) Efeito de diferentes fontes de fósforo (0,5%, m/v) na produção de lipases por *B. ribis* EC-01. Para todos os cultivos, a fonte de nitrogênio foi o NH₄NO₃ (0,2%, m/v). (a, b) A fonte de carbono utilizada foi o óleo de soja (1,0%, v/v) e os cultivos tiveram duração de 5 dias, a 180 rpm e 28 ± 2 °C.

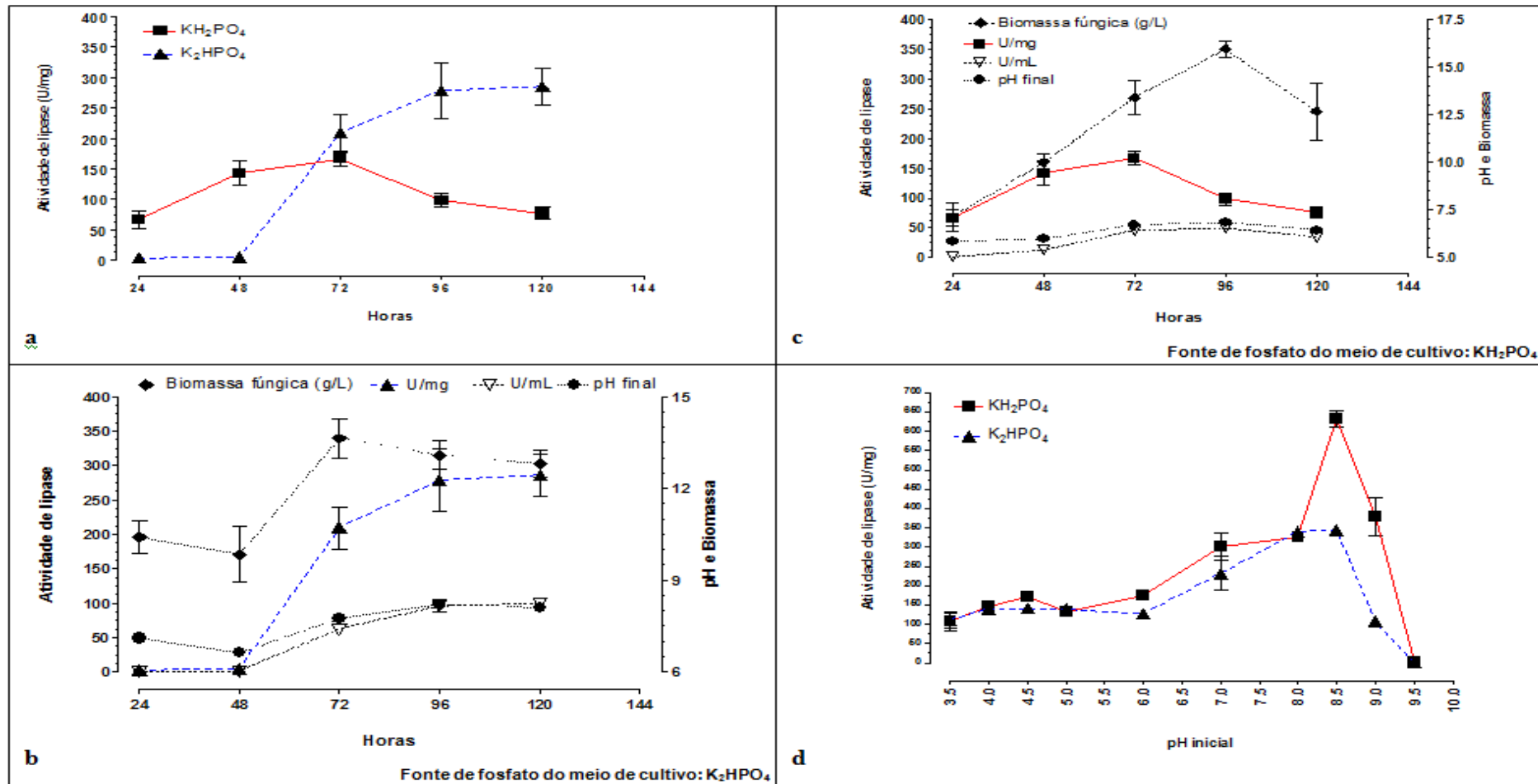


Figura 2 – (a) Atividade específica da lipase (U/mg) de *B. ribis* EC-01 em relação ao tempo de cultivo (horas), sendo KH_2PO_4 ou K_2HPO_4 (0,5%, m/v) as fontes de fosfato do processo fermentativo submerso. (b) Perfil da produção de lipase (U/mg e U/mL) de *B. ribis* EC-01 em cultivos com KH_2PO_4 (0,5%, m/v) em relação a produção de biomassa fúngica (g/L) e pH final do meio. O pH inicial do meio de cultivo (sem ajuste) foi 5,78. (c) Perfil da produção de lipase (U/mg e U/mL) de *B. ribis* EC-01 em cultivos com K_2HPO_4 (0,5%, m/v) em relação a produção de biomassa fúngica (g/L) e pH final do meio. O pH inicial do meio de cultivo (sem ajuste) foi 7,20. (d) Efeito do pH inicial do meio (cultivo de 120 h) na produção de lipase por *B. ribis* EC-01, sendo a fonte de fosfato do meio o KH_2PO_4 ou K_2HPO_4 (0,5%, m/v). Em todos os experimentos (a, b, c ou d) a fonte de carbono utilizada foi o óleo de soja 1,0% (v/v) e a fonte de nitrogênio foi o NH_4NO_3 (0,2%, m/v).

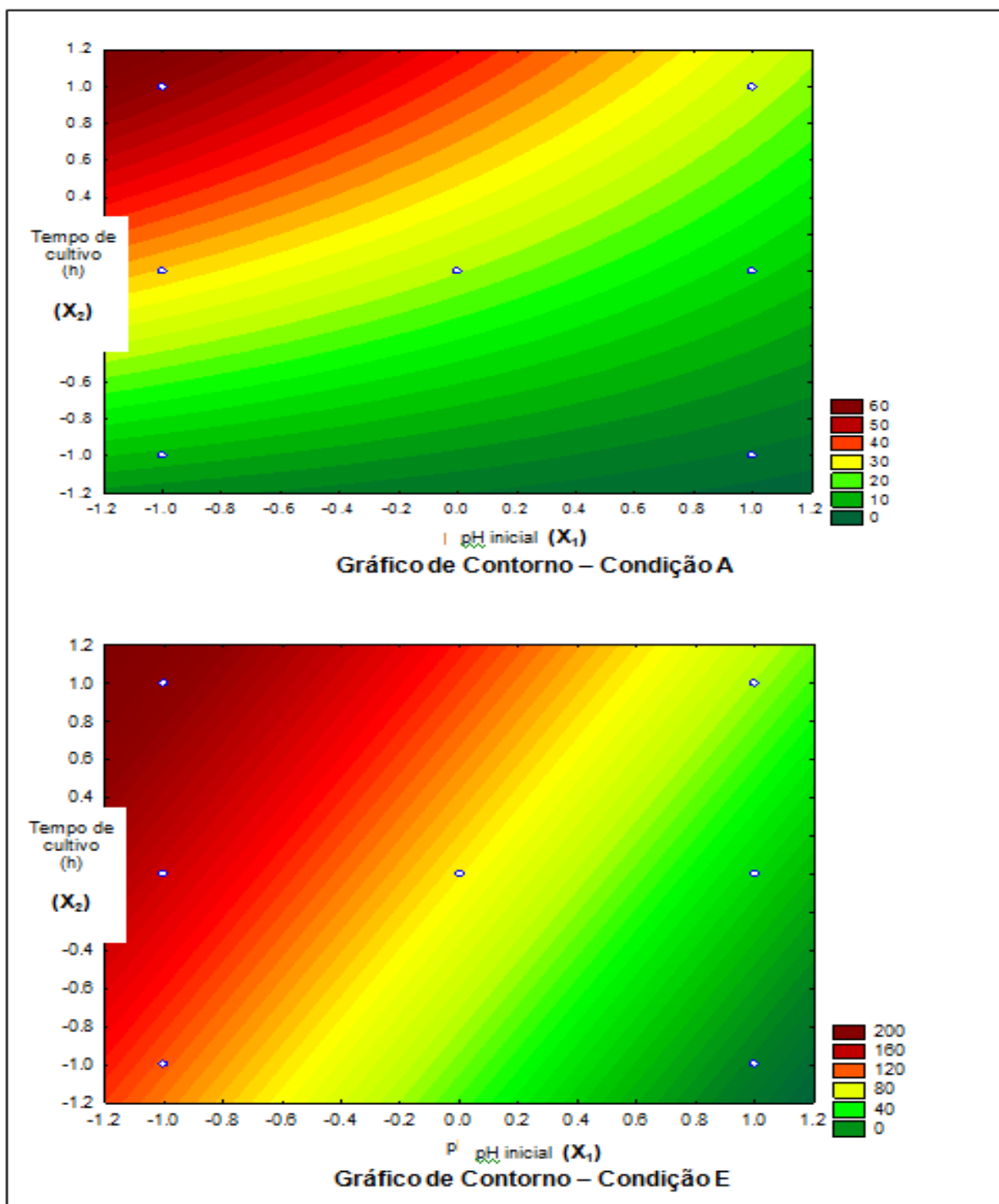


Figura 3 – Gráficos de contorno para o planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} realizado para as Condições de misturas “A” e “E” para a produção de lipase (U/mg) por *B. ribis* EC-01. Perfil da interação “Tempo de cultivo x pH inicial do meio.”

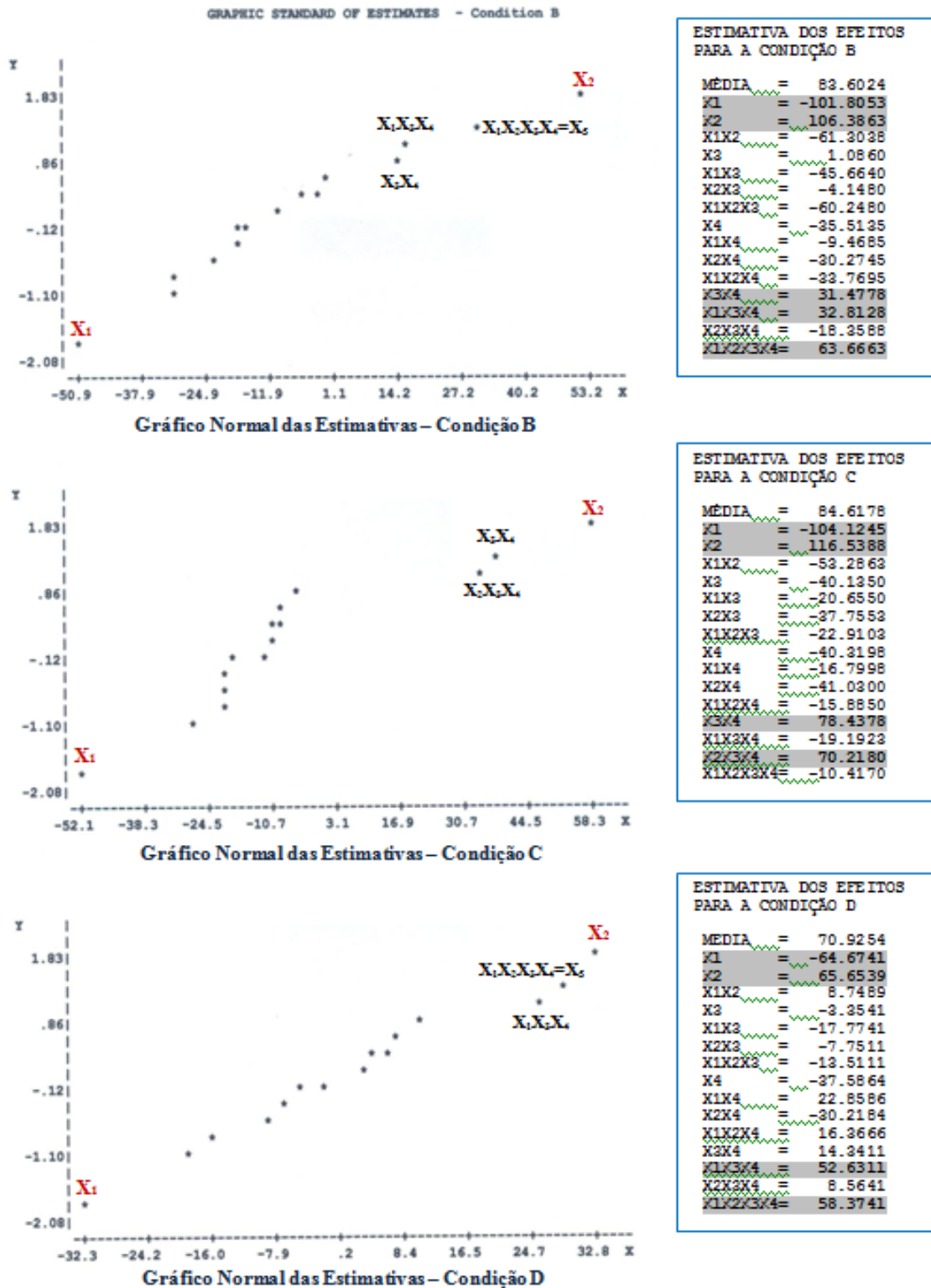


Figura 4 – Estimativa dos efeitos e gráfico normal das estimativas para as Condições de misturas “B, C e D”. O pH inicial do meio e o tempo de cultivo foram as variáveis que mais influenciaram na produção de lipase (U/mg) por *B. ribis* EC-01. (X_1) pH inicial do meio; (X_2) tempo de cultivo (h); (X_3) concentração de NH_4NO_3 (% m/v), (X_4) concentração de KH_2PO_4 (% m/v) e ($X_5 = X_1X_2X_3X_4$) velocidade de rotação (rpm).

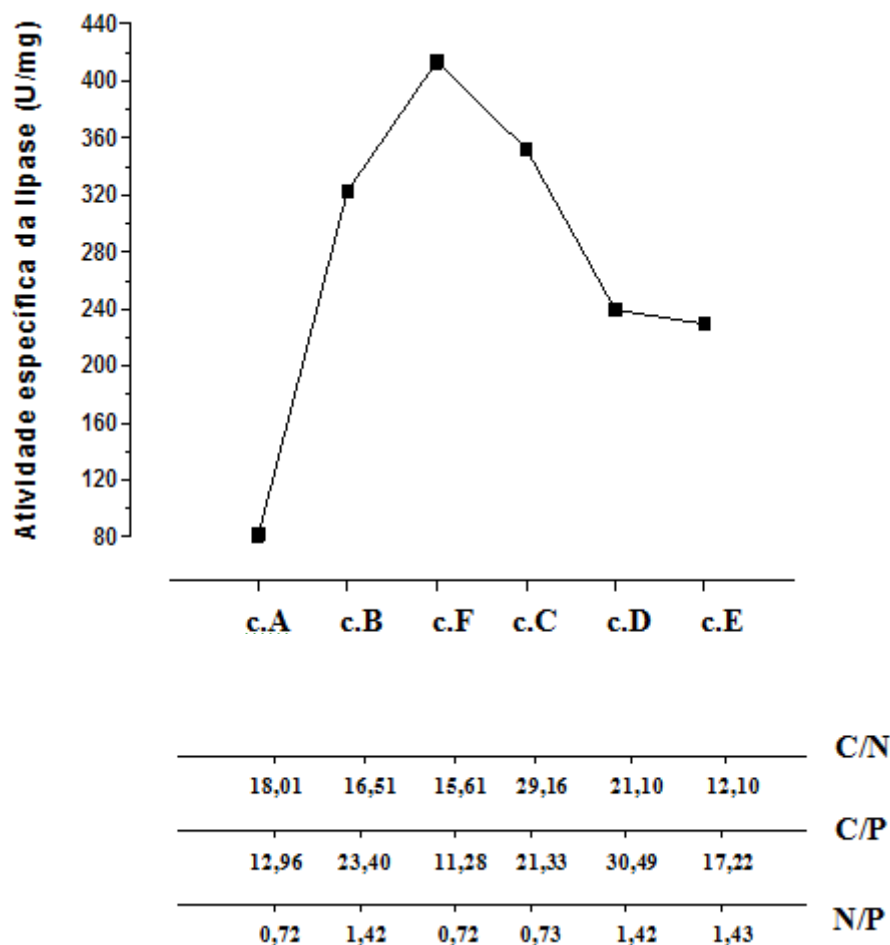


Figura 5 – Diagrama entre as respostas previstas da produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 e as respostas originais para o modelo estatístico de planejamento de misturas.

<u>c.A</u>	c.B	c.F	c.C	c.D	c.E	
18,01	16,51	15,61	29,16	21,10	12,10	C/N
12,96	23,40	11,28	21,33	30,49	17,22	C/P
0,72	1,42	0,72	0,73	1,42	1,43	N/P

Figura 6 – Razão C/N, C/P e N/P para a melhor atividade de lipase (U/mg) obtida em cada uma das Condições de misturas (Condição A= n° 15 (c.A), B= n° 07 (c.B), C= n° 03 (c.C), D= n° 07 (c.D), E= n° 07 (c.E) e F= n° 13 (c.F) (vide Tabelas 2 e 3)). C= Carbono, N= Nitrogênio e P= Fósforo.

Referências

- [1] Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 2001; 19:627-662.
- [2] Saxena, R.K.; Davidson, W.S.; Sheoran, A.; Giri, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochemistry*, 2003; 39:239-247.
- [3] Mala, J.G.S.; Takeuchi, S. Understanding structural features of microbial lipases – An overview. *Analytical Chemistry Insights*, 2008; 3:9-19.
- [4] Gupta, R.; Rathi, P.; Gupta, N.; Bradoo, S. Lipases assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2003; 37:63-71.
- [5] Paques, F.W.; Macedo, G.A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. *Química Nova*, 2006; 29:93-99.
- [6] Ghanem, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*, 2007; 63:1721-1754.
- [7] Essamri, M.; Deyris, V.; Comeau, L. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. *Journal of Biotechnology*, 1998; 60:97-103.
- [8] Salleh, A.B.; Musani, R.; Basri, M.; Ampon, K.; Yunus, W.M.Z.; Razak, C.N.A. Extra- and intra-cellular lipases from a thermophilic *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production. *Canadian Journal of Microbiology*, 1993; 39:978-981.
- [9] Slippers, B.; Wingfield, M.J. *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*, 2007; 21:90-106.
- [10] Umezurike, G. Cellulolytic activities of *Botryodiplodia theobromae* Pat. *Annals of Botany*, 1969; 33:451-462.
- [11] Ogundana, S.K.; Naqvi, S.H.Z.; Ekundayo, J.A. Studies on soft rot of Yams in storage. *Transactions of the British Mycological Society*, 1971; 56:73-80.

- [12] Encinas, O.; Daniel, G. Decay capacity of different strains of the blue stain fungus *Lasiodiplodia theobromae* on various wood species. *Material und Organismen*, 1996; 30:239-258.
- [13] Romero, M.A.; Sánchez, M.E.; Trapero, A. First report of *Botryosphaeria ribis* as a branch dieback pathogen of olive trees in Spain. *Plant Disease*, 2005; 89:208.
- [14] Saldanha, R.L.; Garcia, J.E.; Dekker, R.F.H.; Villas-Boas, L.A.; Barbosa, A.M. Genetic diversity among *Botryosphaeria* isolates and their correlation with cell wall-lytic enzyme production. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2007; 38:259-264.
- [15] Messias, J.M.; 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 and Microbial Technology*, 2009; 45:426-431.
- [16] 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*, 2006; 43:9-14.
- [17] Vasudevan, P.T.; Briggs, M. Biodiesel production – current state of the art and challenges. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2008; 35:421-430.
- [18] Vogel, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Microbial Genetics Bulletin*, 1956; 13:42-43.
- [19] Dekker, R.F.H.; Barbosa, A.M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001; 28:81-88.
- [20] Barros Neto, B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E. Planejamento e otimização de experimentos. Campinas. Ed. da Unicamp, 1995; 244-255.
- [21] Barros Neto, B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3. ed. Campinas. Ed. da Unicamp, 2007; 363-373.
- [22] Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227:680-685.

- [23] Lima, V.M.G.; Krieger, N.; Mitchell, D.A.; Baratti, J.C.; Filippis, I.; Fontana, J.D. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004; 31:53-61.
- [24] Prim, N.; Sánchez, M.; Ruiz, C.; Pastor, F.I.J.; Diaz, P. Use of methylumbeliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003; 22:339-346.
- [25] Diaz, P.; Prim, N.; Pastor, F.I.J. Direct fluorescence-based lipase activity assay. *Biotechniques*, 1999; 27:696-698.
- [26] Blum, H.; Beier, H.; Gross, H.J. Improved silver staining of plant proteins: RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 1987; 8: 93-99.
- [27] Winkler, U. K.; Stuckmann, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 1979; 138:663-670.
- [28] 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 and Biotechnology*, 2003; 41:105-110.
- [29] Stuer, W.; Jaeger, K.E.; Winkler, U.K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 1986; 168:1070-1074.
- [30] Lowry, O.H.; Rosebroug, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951; 193:265-275.
- [31] Hartree, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 1972; 48:422-427.
- [32] Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K. Colorimetric method for determination sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 1956; 28:350-356.
- [33] Somogyi, M. A. A new reagent for determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry*, 1945; 160:61-68.
- [34] Nelson, N.A. Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 1944; 153:376-380.

- [35] Cihangir, N.; Sarikaya, E. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2004; 20:193-197.
- [36] 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*, 2008; 40:445-451.
- [37] Dekker, R.F.H.; Barbosa, A.M.; Giese, E.C.; Godoy, S.D.S.; Covizzi, L.G. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *International Microbiology*, 2007; 10:177-185.
- [38] Galvagno, M.A.; Forchiassin, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. In: Sposito, E. & Azevedo, J. L. (Orgs). *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul. EDUCS, 2004. p.125-169.
- [39] Miranda, O.A.; Salgueiro, A.A.; Pimentel, M.C.B.; Lima Filho, J.L.; Melo, E.H.M.; Durán, N. Lipase production by a brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. *Bioresource Technology*, 1999; 69:145-147.
- [40] Macris, J.B.; Kourentzi, E.; Hatzinikolaou, D.G. Studies on localization and regulation of lipase production by *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, 1996; 31:807-812.
- [41] Gulati, R.; Saxena, R.K.; Gupta, R.; Yadav, R.P.; Davidson, W.S. Parametric optimization of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. *Process Biochemistry*, 1999; 35:459-464.
- [42] Fadiloglu, S.; Erkmen, O. Lipase production by *Rhizopus oryzae* growing on different carbon and nitrogen sources. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999; 79:1936-1938.
- [43] Lin, E.; Ko, H. Glucose stimulates production of the alkaline-thermostable lipase of the edible basidiomycete *Antrodia cinnamomea*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005; 37:261-265.
- [44] Jaeger, K.E.; Ransac, S.; Dijkstra, B.W.; Colson, C.; van Heuvel, M.; Misset, O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994; 15:29-63.
- [45] Ohnishi, K.; Yoshida, Y.; Sekiguchi, J. Lipase production of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1994; 77:490-495.

- [46] Gulati, R.; Isar, J.; Kumar, V.; Prasad, A.K.; Parmar, V. S.; Saxena, R. K. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. *Pure and Applied Chemistry*, 2005; 77:251-262.
- [47] 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*, 2003; 39:459-465.
- [48] Kamini, N.R.; Fujii, T.; Kurosu, T.; Iefuji, H. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. *Process Biochemistry*, 2000; 36:317-324.
- [49] Teng, Y.; Xu, Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. *Bioresource Technology*, 2008; 99:3900-3907.
- [50] Cruz, P.M.; Christen, P.; Farres, A. Medium optimization by a fractional factorial design for lipase production by *Rhizopus delemar*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1993; 76:94-97.
- [51] Dalmau, E.; Montesinos, J.L.; Lotti, M.; Casas, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000; 26:657-663.
- [52] Costas, M.; Deive, F.J.; Longo, M.A. Lipolytic activity in submerged cultures of *Issatchenkia orientalis*. *Process Biochemistry*, 2004; 39:2109-2114.
- [53] Alonso, F.O.M.; Oliveira, E.B.L.; Dellamora-Ortiz, G.M.; Pereira-Meirelles, F.V. Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2005; 22:9-18.
- [54] Muralidhar, R.V.; Chirumamila, R.R.; Marchant, R.; Nigam, P. A response surface approach the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. *Biochemical Engineering Journal*, 2001; 9:17-23.
- [55] Jaeger, K.E.; Eggert, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002; 13:390-397.
- [56] Sarada, R.; Joseph, R. Purification and properties of lipase from the anaerobe *Propionibacterium acidi-propionici*. *Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)*, 1992; 69:974-977.

- [57] Zeng, X.; Xiao, X.; Wang, P.; Wang, F. Screening and characterization of psychrotrophic, lipolytic bacteria from deep-sea sediments. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004; 14:952-958.

CONCLUSÕES

a) *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 foi o isolado que se destacou como produtor de lacase, enquanto que *B. ribis* EC-01 foi o melhor produtor de lipase; em todas as fontes de óleos vegetais ou glicerol estudadas. A ordem decrescente de produção de lipase avaliada qualitativamente em placas de Petri com óleo de soja e Rodamina B para os ascomicetos produtores foi: *B. rhodina* MMGR (*Lasiodiplodia theobromae*, isolado de graviola) > *B. ribis* EC-01 > *B. rhodina* MMBJ (*L. theobromae*, isolado de berinjela).

b) O pH ótimo para a atividade da lipase de *B. ribis* EC-01 foi 8,0 em tampão fosfato de sódio 0,05 mol/L, 55 °C. A enzima foi estável por 24 horas até 55 °C, sendo inativada a 85 °C, após 5 minutos. Também, manteve-se estável na faixa de pH de 1,0 a 10,0 por uma hora à temperatura ambiente (30 ± 2 °C).

c) Os íons K⁺, Zn²⁺, Na⁺, Ba²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺ (1,0 mM) aumentaram a atividade da lipase do *B. ribis* EC-01, enquanto que o Cu²⁺ diminuiu a atividade e o íon Hg²⁺ (10,0 mM) a inibiu em 34%. O Tween 80, SDS e Triton X-100 aumentaram a atividade desta lipase 29, 15 e 3%, respectivamente.

d) A ordem decrescente de atividade da lipase de *B. ribis* EC-01 nos solventes avaliados (99,3%, v/v) foi: isooctano > etanol > butanol > acetona = isopropanol > hexano > metanol > tolueno. Entretanto, a enzima permaneceu 109%, 103% e 96% ativa em glicerol, metanol e etanol (50,0%, v/v), respectivamente.

e) A lipase de *B. ribis* EC-01 é uma enzima constitutiva, não regulada por glucose e a ordem decrescente de sua produção nas fontes de carboidratos avaliadas foi: lactose > sacarose > sacarose comercial > glucose > frutose.

f) Dentre os detergentes avaliados como fonte de carbono, o Tween 80 (1,0%, m/v) proporcionou maior produção de lipase por *B. ribis* EC-01. Entre os ácidos graxos, o ácido esteárico emulsificado com Triton X-100 (0,1%, m/v) foi a melhor fonte para a produção desta enzima, seguido do ácido palmítico. Quanto aos trigliceróis avaliados, a trioleína promoveu maior produção de lipase, enquanto que a tributirina e a tricaprilina inibiram o crescimento do fungo e a produção da lipase. Esta enzima também foi produzida em diferentes concentrações de glicerol (1,0 a 6,0%), entretanto, a maior produção foi em glicerol a 4,0% (m/v).

g) O NH_4NO_3 foi a melhor fonte de nitrogênio para a produção de lipase por *B. ribis* EC-01 e o KH_2PO_4 foi a melhor fonte de fosfato.

h) Através do planejamento estatístico de misturas, realizado para as fontes de carbono glicerol e óleo de soja, o tempo de cultivo e o pH inicial do meio foram as variáveis que mais influenciaram na produção de lipase por *B. ribis* EC-01.

i) Produção adequada de lipase (413,6 U/mg) por *B. ribis* EC-01 foi obtida em 72 horas de cultivo a 120 rpm, com 0,4% (m/v) de NH_4NO_3 , 1,0% (m/v) de KH_2PO_4 e pH inicial 4,5. A melhor relação C/N, C/P e N/P para a mesma condição de cultivo foi 15,61, 11,28 e 0,72, respectivamente. Houve interação entre todas as variáveis do planejamento fatorial (2^5) e o pH inicial do meio e sua interação com o tempo de cultivo foram os efeitos mais significativos para a produção da enzima (U/mg).

j) As lipases de *B. ribis* EC-01 produzidas em qualquer condição de cultivo hidrolisaram ésteres de *p*-nitrofenila e triacilgliceróis de cadeia curta, média e longa. O perfil eletroforético revelado por proteínas e atividade sobre MUF-butirado indicaram que a massa molar destas lipases estão entre 12 e 16 kDa e entre 45 e 80 kDa.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, F. O. M.; OLIVEIRA, E. B. L.; DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; PEREIRA-MEIRELLES, F. V. Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 22, p. 9-18, 2005.
- ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO, V.; BARATTI, J.; Characterization of a thermostable esterase activity from the moderate thermophile *Bacillus licheniformis*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 63, p. 1865-1870, 1999.
- BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; HARDY, G. E. S. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye, Poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 23, p. 93-96, 1996.
- BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; KURTBÖKE, I.; HARDY, G. E. S. *In vivo* decolorization of poly R-478 as a method for screening ligninolytic microorganisms for use in bioremediation. In: PACIFIC RIM BIOTECHNOLOGY CONFERENCE, 4., 1995, Melbourne. **Proceedings...** Melbourne: Conference Organising Committee, 1995. p. 88-90.
- BARBOSA, A. M.; STELUTI, R. M.; DEKKER, R. F. H.; CARDOSO, M. S.; CORRADI DA SILVA, M. L. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3; 1→6)-β-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 338, p. 1691-1698, 2003.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas. Ed. da Unicamp, 1995. p. 244-255.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 3. ed. Campinas. Ed. da Unicamp, 2007. p. 363-373.
- BECKER, S.; THEILE, S.; HEPPELER, N.; MICHALCZYK, A.; WENTZEL, A.; WILHELM, S.; JAEGER, K. E.; KOLMAR, H. A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 579, p. 1177-1182, 2005.
- BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIERE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 102, p. 133-153, 2000.
- BERTO, P.; COMMÉNIL, P.; BELINGHERI, L.; DEHORTER, B. Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 180, p. 183-189, 1999.
- BEVILAQUA, J. V.; PINTO, J. C.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; ALVES, T. L. M.; FREIRE, D. M. G. Enzymatic hydrolysis by immobilized lipase applied to a new prototype anti-asthma drug. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 21, p. 103-110, 2004.

BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W (Org.).

Biotecnologia industrial. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. v. 3, p.264.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins: RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 8, p. 93-99, 1987.

BORDERIE, V. M.; BOUCIER, T. M.; POIROT, J. L.; BAUDRIMONT, M.; SAINT-MAUR, P. P.; LAROCHE, L. Endophthalmitis after *Lasiodiplodia theobromae* corneal abcess. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, Berlin, v. 235, p. 259-261, 1997.

BOUTAIBA, S.; BHATNAGAR, T.; HACENE, H.; MITCHELL, D. A.; BARATTI, J. C. Preliminary characterization of a lipolytic activity from an extremely halophilic archeon, *Natronococcus* sp. **Journal of Molecular Catalysis: B - Enzymatic**, Amsterdam, v. 41, p. 21-26, 2006.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Lei nº 11.097/05, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nos 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 jan. 2005. Disponível em:

<www.mme.gov.br/download.do?attachmentId=2654&download>. Acesso em: 23 fev. 2008.

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; BARROS NETO, B. Pacote de programas computacionais para planejamento e otimização de experimentos, 1995. Disponível em : <lattes.cnpq.br>. Acesso em: 23 out. 2008.

BURKET, J. F. M.; MALDONADO, R. R.; MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M. I. Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 80, p. 61-67, 2005.

BURKET, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, Essex, v. 91, p. 77-84, 2004.

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil grease content. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, p. 2195-2210, 2006.

CHAHINIAN, H.; VANOT, G.; IBRIK, A.; RUGANI, N.; SARDA, L.; COMEAU, L. C. Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium*. Purification and characterization of a partial acylglycerol lipase. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 64, p. 215-222, 2000.

CHANDER, H.; BATISH, V. K.; GHODEKAR, D. R.; SRINIVASAN, R. A. Factors affecting lipase production in *Rhizopus nigricans*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 64, p. 193-196, 1981.

CHEN, X.; DU, W.; LIU, D. Response surface optimization of biocatalytic biodiesel production with acid oil. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 40, p. 423-429, 2008.

CHO, A. R.; YOO, S. K.; KIM, E. J. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 186, p. 235-238, 2000.

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

COMMÉNIL, P.; BELINGHERI, L.; BAUW, G.; DEHORTER, B. Molecular characterization of a lipase in *Botrytis cinerea* by components of grape berry cuticle. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 37-43, 1999.

CORDI, L.; DURÁN, N. Imobilização de lacase fúngica em diversos suportes. In: CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP, 11., 2001, Campinas. **Caderno de Resumos**. Campinas: UNICAMP, Pró-Reitoria de Pesquisa, 2001. p. 89.

COSTAS, M.; DEIVE, F.; J.; LONGO, M.; A. Lipolytic activity in submerged cultures of *Issatchenkia orientalis*. **Process Biochemistry**, London, v. 39, p. 2109-2114, 2004.

CÔTÉ, A.; SHARECK, F. Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 42, p. 381-388, 2008.

CUNHA, M. A. A.; BARBOSA, A. M.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of constitutive and inducible laccases by *Botryosphaeria* sp. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 43, p. 385-392, 2003.

CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods in Enzymology**. Part A: Biotechnology, San Diego, v. 284, p. 3-27, 1997.

CYGLER, M.; SCHRAG, J. D.; SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; SILMAN, I.; GENTRY M. K.; DOCTOR, B. P. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases and related proteins. **Protein Science**, Cold Spring-Harbor, v. 2, p. 366-382, 1993.

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**, Oxford, v. 81, p. 1586-1593, 2006.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 623-630, 2004.

- DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, p. 657-663, 2000.
- DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 28, p. 81-88, 2001.
- DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; GIESE, E. C.; GODOY, S. D. S.; COVIZZI, L. G. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **International Microbiology**, Barcelona, v. 10, p. 177-185, 2007.
- DEREWENDA, U.; BRZOZOWSKI, A. M.; LAWSON, D. M.; DEREWENDA, Z. S. Catalysis at the interface: anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. **Biochemistry**, Easton, v. 31, p. 1532-1541, 1992.
- DEREWENDA, U.; SWENSON, L.; GREEN, R.; WEI, Y.; YAMAGUCHI, S.; JOERGER, R.; HAAS, M. J.; DEREWENDA, Z. S. Current progress, in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. **Protein Engineering**, Oxford, v. 7, p. 551-557, 1994.
- DIAZ, J. C. M.; RODRÍGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, p. 1042-1050, 2006.
- DIAZ, P.; PRIM, N.; PASTOR, F. I. J. Direct fluorescence-based lipase activity assay. **Biotechniques**, Natick, v. 27, p. 696-698, 1999.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric method for determination sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.
- ENCINAS, O.; DANIEL, G. Decay capacity of different strains of the blue stain fungus *Lasiodiplodia theobromae* on various wood species. **Material und Organismen**, Berlin, v. 30, p. 239-258, 1996.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Introdução. In: SPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. p. 9.
- ESSAMRI, M.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 60, p. 97-103, 1998.
- FADILOGLU, S.; ERKMEN, O. Lipase production by *Rhizopus oryzae* growing on different carbon and nitrogen sources. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, p. 1936-1938, 1999.

FALONY, G.; ARMAS, J. C.; MENDOZA, J. C. D.; HERNÁNDEZ, J. L. M. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 2, p. 235-240, 2006.

FERNANDES, M. L. M.; KRIEGER, N.; BARON, A. M.; ZAMORA, P. P.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis: B - Enzymatic**, Amsterdam, v. 30, p. 43-49, 2004.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis: B - Enzymatic**, Amsterdam, v. 44, p. 8-13, 2007.

GARCIA, J. E.; VILAS-BOAS, L. A.; DEKKER, R. F. H.; FÚNGARO, M. H. P.; BARBOSA, A. M. Molecular identification of a species of *Botryosphaeria* sp.; *Botryosphaeria rhodina*. GenBank, 2004. Acession number: AY612337.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, Oxford, v. 63, p. 1721-1754, 2007.

GIESE, E. C.; COVIZZI, L. G.; BORSATO, D.; DEKKER, R. F. H.; CORRADI DA SILVA, M. L.; BARBOSA, A. M. Botryosphaeran, a new substrate for the production of β -1,3-glucanases by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. **Process Biochemistry**, London, v. 40, p. 3783-3788, 2005.

GIESE, E. C.; COVIZZI, L. G.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, Maringá, v. 26, p. 463-470, 2004.

GOBBETTI, M.; LANCIOTTI, R.; ANGELIS, M.; CORBO, M. R.; MASSINI, R.; FOX, P. Study of the effects of temperature, pH, NaCl and a_w on the proteolytic and lipolytic activities of cheese-related lactic acid bacteria by quadratic response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 25, p. 795-809, 1999.

GOMBERT, A. K.; PINTO, A. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, Maringá, v. 35, p. 85-90, 1999.

GOMES, P. M.; FREIRE, D. M. G. Processo de produção de lipase por *Penicillium restrictum*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES - SINAFERM, 14., 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: UFSC, 2003. Disponível em: <www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos>. Acesso em: 25 nov. 2007.

GOPINATH, S. C. B.; HILDA, A.; PRIYA, T. L. ANNADURAI, G. Purification of lipase from *Cunninghamella verticillata* and optimization of enzyme activity using response surface methodology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 18, p. 449-458, 2002.

GORDILLO, M. A.; OBRADORS, N.; MONTESINOS, J. L.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÀ, C. Stability studies and effect of the initial oleic acid concentration on lipase production by *Candida rugosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 43, p. 38-41, 1995.

GOWLAND, P.; KERNICK, M.; SUNDARAM, T. K. Thermophilic bacterial isolates producing lipase. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 48, p. 339-343, 1987.

GULATI, R.; ISAR, J.; KUMAR, V.; PRASAD, A. K.; PARMAR, V. S.; SAXENA, R. K. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 77, p. 251-262, 2005.

GULATI, R.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. Fermentation and downstream processing of lipase from *Aspergillus terreus*. **Process Biochemistry**, London, v. 36, p. 149-155, 2000.

GULATI, R.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R.; YADAV, R. P.; DAVIDSON, W. S. Parametric optimization of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. **Process Biochemistry**, London, v. 35, p. 459-464, 1999.

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

GUPTA, R.; RATHI, P.; GUPTA, N.; BRADDOO, S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Duluth, v. 37, p. 63-71, 2003.

GUTARRA, L. E. M.; CAVALCANTI, E. D. C.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA JR.; G. L. Lipase production by solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v. 121-124, p. 105-116, 2005.

GUTARRA, L. E. M.; GODOY, M. G.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Inoculum strategies for *Penicillium simplicissimum* lipase production by solid-state fermentation using a residue from the babassu oil industry. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 82, p. 313-318, 2007.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; MIURA, K.; YAMAJI, H.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 101, p. 328-333, 2006.

HAMA, S.; YAMAJI, H.; FUKUMIZU, T.; NUMATA, T.; TAMALAMPUDI, S.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Bioediesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 34, p. 273-278, 2007.

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

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, p. 235-251, 2006.

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**, Amsterdam, v. 43, p. 9-14, 2006.

HEGEDUS, D. D.; KHACHATOURIANS, G. G. Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 10, p. 637-342, 1988.

HELISTO, P.; KORPELA, T. Effect of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 23, p. 113-117, 1998.

HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym[®] 435 and Lipozyme[®] TL IM. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 277-286, 2008.

HIREMATH, S. C.; PATIL, C. G.; PATIL, K. B.; NAGASAMPIGE, M. H. Genetic diversity of seed lipid content and fatty acid composition in some species of *Sesamum* L. (*Pedaliaceae*). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, n. 5, p. 539-543, 2007.

HOLMQUIST, M. Alpha beta - hidrolases fold enzymes: structures, functions and mechanisms. **Current Protein and Peptide Science**, Gainesville, v. 1, n. 2, p. 209-235, 2000.

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

JAEGER, K. E.; KHARAZMI, A.; HOIBY, N. Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: biochemical characterization and effects on human neutrophil and monocyte function in vitro. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 10, p. 173-182, 1991.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; van HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 15, p. 29-63, 1994.

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

JAEGER, K. E.; SCHNEIDINGER, B.; ROSENAU, F.; WERNER, M.; LANG, D.; DIJKSTRA, B. W.; SCHIMOSSEK K.; ZONTA, A.; REETZ, M. T. Bacterial lipases for biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis; B - Enzymatic**, Amsterdam, v. 3, p. 3-12, 1997.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications in lipases. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, p. 390-397, 2002.

JENSEN, R. G. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. **Lipids**, Champaign, v. 18, p. 650-657, 1983.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; KUMAR, P. A. Studies on the enhanced production of extracellular lipase by *Staphylococcus epidermidis*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 52, p. 315-320, 2006.

JUNG, W. H.; KIM, H. K.; LEE, C. Y.; OH, T. K. Biochemical properties and substrate specificity of lipase from *Staphylococcus aureus* B56. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 12, n. 1, p. 25-30, 2002.

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

KAMINI, N.R.; FUJII, T.; KUROSU, T.; IEFUJI, H. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. **Process Biochemistry**, London, v. 36, p. 317-324, 2000.

KAMINI, N.R.; MALA, J. G. S., PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. **Process Biochemistry**, London, v. 33, p. 505-511, 1998.

KASHMIRI, M.; A.; ADNAN, A.; BUTT, B.; W. Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma viride*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, 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**, Amsterdam, v. 40, p. 121-126, 2006.

KEMPKA, A.; P.; LIPKE, N.; L.; PINHEIRO, T.; L.; F.; MENONCIN, S.; TREICHEL, H.; FREIRE, D.; M.; G.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Heidelberg, v. 31, p. 119-125, 2008.

KHATTABI, M.; GELDER, P.; BITTER, W.; TOMAMASSEN, J. Role of the calcium ion and the disulfide bond in the *Burkholderia glumae* lipase. **Journal of Molecular Catalysis: B- Enzymatic**, Amsterdam, v. 22, p. 329-338, 2003.

KOJIMA, Y.; SHIMIZU, S. Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 96, p. 219-226, 2003.

KOUKER, G.; JAEGER, K. E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 211-213, 1987.

KRIEGER, N. **Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum***. 1995. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LI, D.; WANG, B.; TAN, T. Production enhancement of *Rhizopus arrhizus* by feeding oleic acid. **Journal of Molecular Catalysis: B - Enzymatic**, Amsterdam, v. 43, p. 40-43, 2006

LI, W.; DU, W.; LIU, D. Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis: B - Enzymatic**, Amsterdam, v. 45, p. 122-127, 2007.

LIMA, V. M. G. **Lipases de *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx IOC 4212**. 2000. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LIMA, V. M. G. **Produção e purificação da lipase de *Bacillus megaterium* e sua aplicação em biocatálise em solventes orgânicos**. 2004. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; BARATTI, J. C.; FILIPPIS, I.; FONTANA, J. D. Evaluation of the potencial for use in biocatalysis of lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis: B - Enzymatic**, Amsterdam, v. 31, p. 53-61, 2004b.

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**, Amsterdam, v. 18, p. 65-71, 2004a.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M. I. M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Effect of the nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 41, 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**, New York, v. 39, p. 98-102, 2006.

LIN, E.; KO, H. Glucose stimulates production of the alkaline-thermostable lipase of the edible basidiomycete *Antrodia cinnamomea*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, p. 261-265, 2005.

LIU, C. H.; LU, W. B.; CHANG, J. S. Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. by response surface methodology. **Process Biochemistry**, London, v. 41, p. 1940-1944, 2006.

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**, Amsterdam, v. 40, p. 445-451, 2008.

LONGHI, S.; CZJZEK, M.; LAMZIN, V.; NICOLAS, A.; CABBILLAU, C. Atomic resolution (1.0 Å) crystal structure of *Fusarium solani* cutinase: stereochemical analysis. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 268, p. 779-799, 1997.

LONGO JÚNIOR, L. S.; BOMBONATO, F. I.; FERRAZ, H. M. C. Métodos de preparação de lactonas de anel médio. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 415-424, 2007.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUG, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 32, p. 38-46, 2004.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 38, p. 715-721, 2002.

MAIA, M. M. D.; MORAIS, M. M. C.; MORAIS JÚNIOR, M. A.; MELO, E. H. M.; LIMA FILHO, J. L. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, p. 304-309, 1999.

MALA, J. G. S.; EDWINOLIVER, N. G.; KAMINI, N. R.; PUVANAKRISHNAN. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 53, p. 247-253, 2007.

MALA, J. G. S.; TAKEUCHI, S. Understanding structural features of microbial lipases: an overview. **Analytical Chemistry Insights**, v. 3, p. 9-19, 2008.

MARANGONI, A. G. *Candida* and *Pseudomonas* lipase – catalyzed hydrolysis of butteroil in the absence of organic solvents. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, p. 1096-1099, 1994.

MARCHI, C. E.; BORGES, M. F.; MIZUBUTI, E. S. G. Atividade amilolítica e pectinolítica de *Alternaria solani* e a relação com a agressividade em tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 32, p. 345-352, 2006.

MARGOLIN, A. L. Enzymes in the synthesis of chiral drugs. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 15, p. 266-280, 1993.

MESSIAS, J. M.; 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 and Microbial Technology**, New York, v. 45, p. 426-431, 2009.

- MIRANDA, O. A.; SALGUEIRO, A. A.; PIMENTEL, M. C. B.; LIMA FILHO, J. L.; MELO, E. H. M.; DURÁN, N. Lipase production by a brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. **Bioresource Technology**, Essex, v. 69, p. 145-147, 1999.
- MOHALI, S.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Two new *Fusicoccum* species from *Acacia* and *Eucalyptus* in Venezuela, based on morphology and DNA sequence data. **Mycological Research**, Cambridge, v. 110, p. 405-413, 2006.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 6.ed. New York: John Wiley & Sons, 2005.
- MOSBAH, H.; SAYARI, A.; HORCHANI, H.; GARGOURI. Involvement of Gly 311 residue on substrate discrimination, pH and temperatura dependency of recombinat *Staphylococcus xylosus* lipase: A study with emulsified substrate. **Protein Expression and Purification**, v. 55, p. 31-39, 2007.
- MURALIDHAR, R. V.; CHIRUMAMILA, R. R.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. A response surface approach the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 9, p. 17-23, 2001.
- NELSON, N. A. Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 153, p. 376-380, 1944.
- NGUYEN, D.; ZHANG, X.; JIANG, Z. H.; AUDET, A.; PAICE, M. G.; RENAUD, S.; TSANG, A. Bleaching of kraft pulp by a commercial lipase: Acessory enzymes degrade hexenuronic acids. **Enzyme and Microbial Technology** New York, v. 43, p. 130-136, 2008. Special Issue: Biotechnology of Renewable Resources, Biomass and Biofuels.
- NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, p. 769-777, 2005.
- NOVO NORDISK A/S. **Alkaline lipolytic enzyme**. Hirayama; S.; Halkier, T. 1996. World Intellectual Property Organization. International Application Published Under The Patent Cooperation Treaty (PCT). WO 96/30502. Disponível em: <<http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=1996030502>>. Acesso em: 23 out. 2008.
- OGUNDANA, S. K.; NAQVI, S. H. Z.; EKUNDAYO, J. A. Studies on soft rot of Yams in storage. **Transation British of Mycological Society**, v. 56, p. 73-80, 1971.
- OLIVEIRA, M. Biodiesel em ascensão. **Revista Pesquisa FAPESP**, n.134, 2007. Disponível em: <www.revistapesquisa.fapesp.br/?art=3200&bd=1&pg=1>. Acesso em: 23 out. 2008.
- PALMA, M. B.; PINTO, A. L.; GOMBERT, A. K.; SEITZ, K. H.; KIVATINITZ, S. C.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 84, p. 1137-1145, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

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

PERA, L. M.; ROMERO, C. M.; BAIGORI, M. D.; CASTRO, G. R. Catalytic properties of lipase extracts from *Aspergillus niger*. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 44, p. 247-252, 2006.

PETERSEN, M.; DANIEL, R. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Clostridium tetanomorphum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 22, p. 431-435, 2006.

POKORNY, D.; CIMERMAN, A.; STEINER, W. *Aspergillus niger* lipases: induction, isolation and characterization of two lipases from a MZKI A116 strain. **Journal of Molecular Catalysis: B - Enzymatic**, Amsterdam, v. 2, p. 215-222, 1997.

PRAZERES, J. N.; CRUZ, J. A. B.; PASTORE, G. M. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 505-509, 2006.

PRIM, N.; SÁNCHEZ, M.; RUIZ, C.; PASTOR, F. I. J.; DIAZ, P. Use of methylumbeliferoyl-derivative substrates for lipase activity characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 22, p. 339-346, 2003.

RANGANATHAN, S. V.; SRINIVASAN, L. N.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 3975-3981, 2008.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005. p.125-134.

RODRIGUEZ, J. A.; MATEOS, J. C.; NUNGARAY, J.; GONZÁLEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 41, p. 2264-2269, 2006.

ROLLOF, J.; BRACONIER, J. H.; SÖDERSTRÖN, C.; NILSSON-EHLE, P. Interference of *Staphylococcus aureus* lipase with human granulocyte function. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 7, p. 505-510, 1988.

ROMERO, M. A.; SÁNCHEZ, M. E.; TRAPERO, A. First report of *Botryosphaeria ribis* as a branch dieback pathogen of olive trees in Spain. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 208, 2005.

ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, p. 648-653, 2007.

RUIZ, C.; BLANCO, A.; PASTOR, F. I. J.; DIAZ, P. Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of LipA, a novel subfamily I.4 bacterial lipase. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 217, p. 263-267, 2002.

SAKURAI, H.; POKORNÝ, J. The development and application of novel vegetable oils tailor-made for specific human dietary needs. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 105, p. 769-778, 2003.

SALDANHA, R. L.; GARCIA, J. E.; DEKKER, R. F. H.; VILLAS-BOAS, L. A.; BARBOSA, A. M. Genetic diversity among *Botryosphaeria* isolates and their correlation with cell wall-lytic enzyme production. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 259-264, 2007.

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

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esteres emulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 30, p. 513-521, 1958.

SAXENA, R. K.; GHOSH, P. K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W. S.; BRADDOO, S.; GULATI, R. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. **Current Science**, Bangalore, v. 77, p. 101-115, 1999.

SAXENA, R.K.; DAVIDSON, W. S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, London, v. 39, p. 239-247, 2003.

SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H. C.; HUBE, B. Hidrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, Berlin, v. 48, p. 365-377, 2005.

SECUNDO, F.; CARREA, G.; TARABIONO, C.; GATTI-LAFRANCONI, P.; BROCCA, S.; LOTTI, M.; JAEGER, K. E.; PULS, M.; EGGERT, T. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. **Journal of Molecular Catalysis: B - Enzymatic**, Amsterdam, v. 39, p. 166-170, 2006.

SHAH, D. B.; WILSON, J. B. Egg yolk factor of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 89, p. 949-953, 1965.

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

SHIH, I. L.; HUNG, S. H.; CHEN, F. Y.; JU, H. Y.; SHIEH, C. J. Optimized synthesis of lipase-catalyzed l-methyl butyrate by *Candida rugosa* lipase. **Food Chemistry**, London, v. 100, p. 1223-1228, 2007.

SILVA, C. C.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. S. S. F.; CORRADI DA SILVA, M. L.; BARBOSA, A. M. Effect of soybean oil and Tween 80 on the production of botryosphaeran by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Process Biochemistry**, London, v. 42, p. 1254-1258, 2007.

- SIMONS, J. W. F. A.; VAN KAMPEN, M. D.; RIEL S.; GÖTZ, F.; EGMOND, M. R.; VERHEIJ, H. M. Cloning, purification and characterisation of the lipase from *Staphylococcus epidermidis*: Comparison of the substrate selectivity with those of other microbial lipases. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 253, p. 675-683, 1998.
- SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2/3, p. 90-106, 2007.
- SOMMER, P. BORMANN, C.; GÖTZ, F. Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3553-3560, 1997.
- SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 160, p. 61-68, 1945.
- STASINOPOULOS, S. J.; SEVIOUR, R. J. Stimulation of exopolysaccharide production in the fungus *Acremonium persicinum* with fatty acids. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 36, p. 778-782, 1990.
- STEHR, F.; KRETSCHMAR, M.; KRÖGER, C.; HUBE, B.; SCHÄFER, W. Microbial lipases as virulence factors. **Journal of Molecular Catalysis: B - Enzymatic**, Amsterdam, v. 22, p. 347-355, 2003.
- STELUTI, R.M.; GIESE, E. C.; PIGGATO, M. M.; SUMIYA, A. F. G.; COVIZZI, L. G.; JOB, A. E.; CARDOSO, M. S.; CORRADI DA SILVA, M. L.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 44, p. 480-486, 2004.
- STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 168, p. 1070-1074, 1986.
- SUN, S. Y.; XU, Y. Membrane-bound 'synthetic lipase' specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative investigation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, p. 1336-1342, 2009.
- SZCZESNA-ANTCZAK, M.; ANTCZAK, T.; PIOTROWICZ-WASIAK, M.; RZYSKA, M.; BINKOWSKA, N.; BIELECKI, S. Relationships between lipases and lipids in mycelia of two *Mucor* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, p. 1214-1222, 2006.
- SZTAJER, H.; LÜNSDORF, H.; ERDMANN, H.; MENGE, U.; SCHMID, R. Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. **Biochimica et Biophysica Acta: Lipids and Lipid Metabolism**, Amsterdam, v. 1124, p. 253-261, 1992.

TAMALAMPUDI, S.; TALUKDER, M. R.; HAMA, S.; NUMATA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 39, p. 185-189, 2008.

TENG, Y.; XU, Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 3900-3907, 2008.

THE UNIVERSITY OF ARIZONA. **Department of biochemistry and molecular biophysics**. Disponível em: <www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/ENZYMES/lipase.html>. Acesso em: 12 out. 2007.

TOIDA, J.; FUKUZAWA, M.; KOBAYASHI, G.; ITO, K.; SEKIGUCHI, J. Cloning and sequencing of the triacylglycerol lipase gene of *Aspergillus oryzae* and its expression in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 189, p. 159-164, 2000.

TOM, R. A.; CRISAN, E. V. Assay for lipolytic and proteolytic activity using marine substrates. **Applied Microbiology**, Washington, v. 29, p. 205-210, 1975.

TREVISAN, H. C. Lipases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. (Ed.). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p.115-135.

TRISTÃO, A. P.; VICI, A. C.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Caracterização de lipases produzidas por *Trichoderma pseudokoningii*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – SIICUSP: Área Biológicas, 15., 2007. Ribeirão Preto, SP. **Anais...** Ribeirão Preto, 2007.

UMEZURIKE, G. Cellulolytic activities of *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Annals of Botany**, London, v. 33, p. 451-462, 1969.

URIOSTE, D.; CASTRO, M. B. A.; BIAGGIO, F. C.; CASTRO, H. F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 407-412, 2008.

VASCONCELOS, A. F. D. **Efeito indutor do álcool veratrílico na produção de enzimas envolvidas na degradação da parede celular de vegetais pelo fitopatógeno ligninolítico *Botryosphaeria* sp.** 2001. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

VASCONCELOS, A. F. D.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, F. H.; SCARMINIO, I. S.; REZENDE, M. I. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. **Process Biochemistry**, London, v. 35, p. 1131-1138, 2000.

VERGER, R. Enzyme kinetics of lipolysis. **Methods in enzymology**, New York, v. 64, p. 340-392, 1980.

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

VOIGT, C. A.; SCHÄFER, W.; SALOMON, S. A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. **The Plant Journal**, Oxford, v. 42, p. 364-375, 2005.

WALSH, C. Enabling the chemistry of life. **Nature**. London, v. 409, p. 226-231, 2001.

WARNER, J.C.; CANNON, A. S.; DYE, K.M. Green Chemistry. **Environmental Impact Assessment Review**, New York, v. 24, p. 775-799, 2004.

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

YOSHIDA, F.; MOTAI, H.; ICHISHIMA, E. Effect of lipid materials on the production of lipase by *Torulopsis ernobii*. **Applied Microbiology**, Washington, v. 16, p. 845-847, 1968.

YOUSSEF, F.; BILIADERIS, C. G.; ROUKAS, T. Enhancement of pullulan production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture using olive oil and sucrose as carbon sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 74, p. 13-30, 1998.

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

ZENG, X.; XIAO, X.; WANG, P.; WANG, F. Screening and characterization of psychrotrophic, lipolytic bacteria from deep-sea sediments. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 14, p. 952-958, 2004.

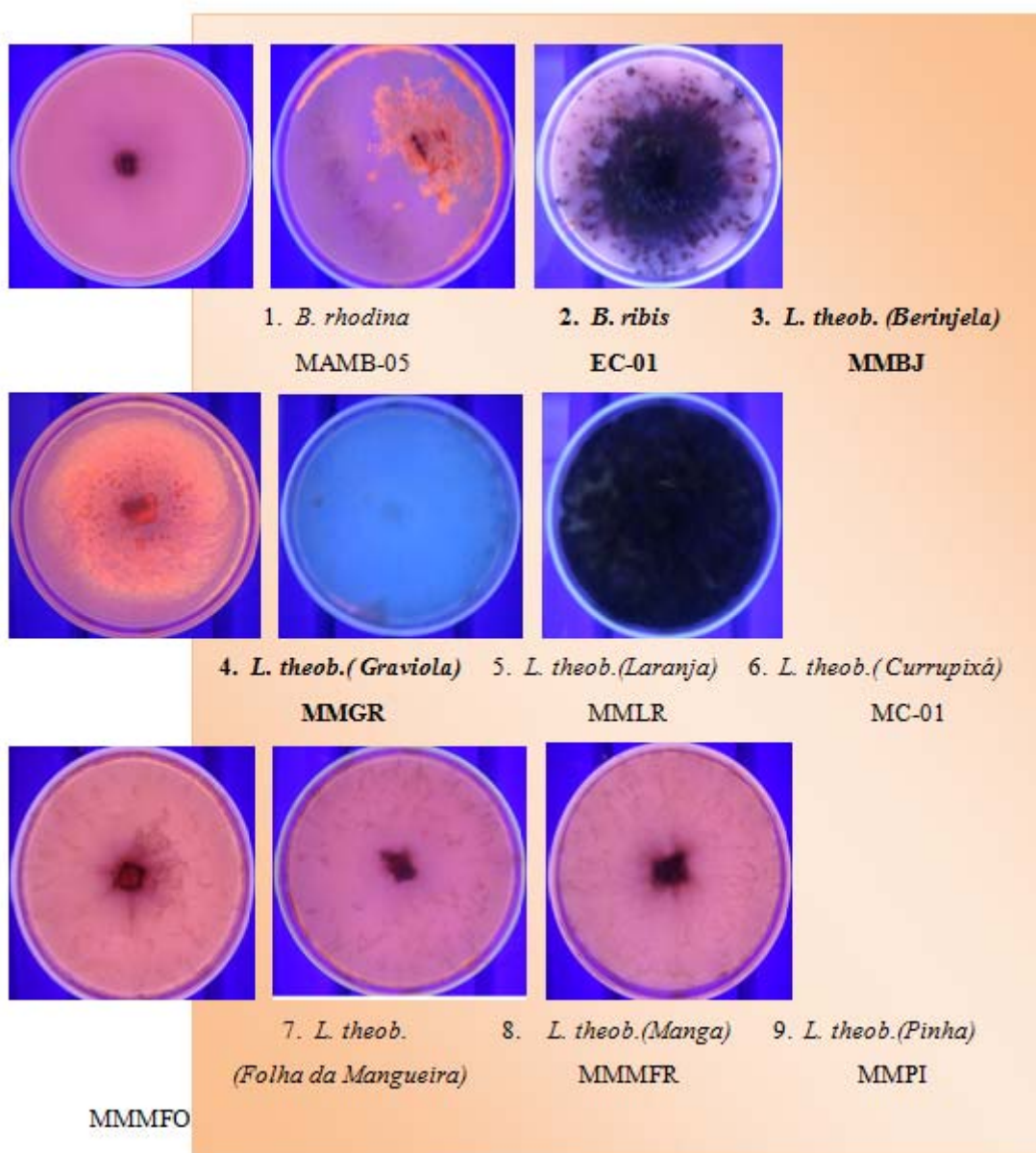
ZHANG, X. ; EIGENDORF, G.; STEBBING, D. W.; MANSFIELD, S. D.; SADDLER, J. N. Degradation of trilinolein by laccase enzymes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 405, p. 44-54, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Visualização da produção de lipase por ascomicetos do gênero *Botryosphaeria* em cultivo sólido, contendo óleo de soja (1,0%, v/v) e Rodamina B (0,001%, m/v).

Avaliação dos melhores fungos produtores



Produção de lipase por ascomicetos do gênero *Botryosphaeria* em cultivo sólido, contendo óleo de soja (1,0%, v/v) e Rodamina B. O halo alaranjado ao UV (302 nm) foi evidenciado após 5 dias de cultivo.

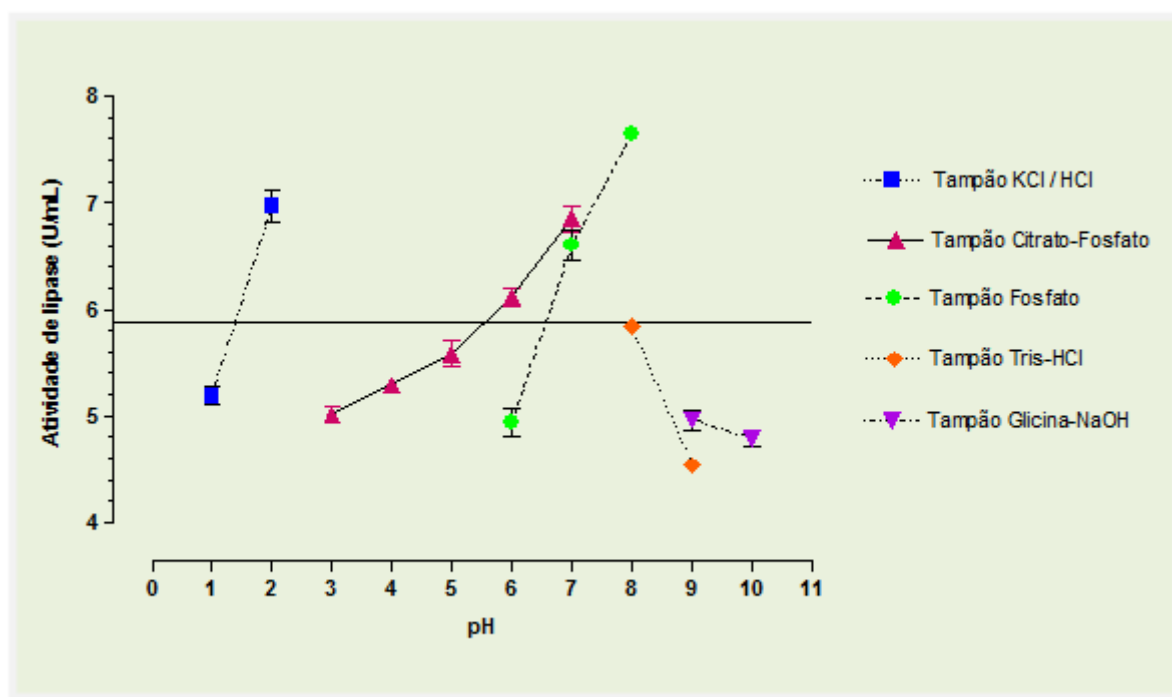
Avaliação qualitativa da produção de lipases em placas de Petri contendo óleo de soja (1,0%, v/v) e Rodamina B, pelos isolados de *Botryosphaeria*.

Isolados de <i>Botryosphaeria</i>	Produção de lipase (Fluorescência)*
1. <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05	-
2. <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01	+++
3. <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Berinjela) MMBJ	+
4. <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Graviola) MMGR	++++
5. <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Laranja) MMLR	-
6. <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Madeira Currupixá) MC-01	-
7. <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Folha da Mangueira) MMMFO	-
8. <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Manga) MMMFR	-
9. <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pinha) MMPI	-

*A fluorescência alaranjada foi observada ao UV (302) nm

APÊNDICE B

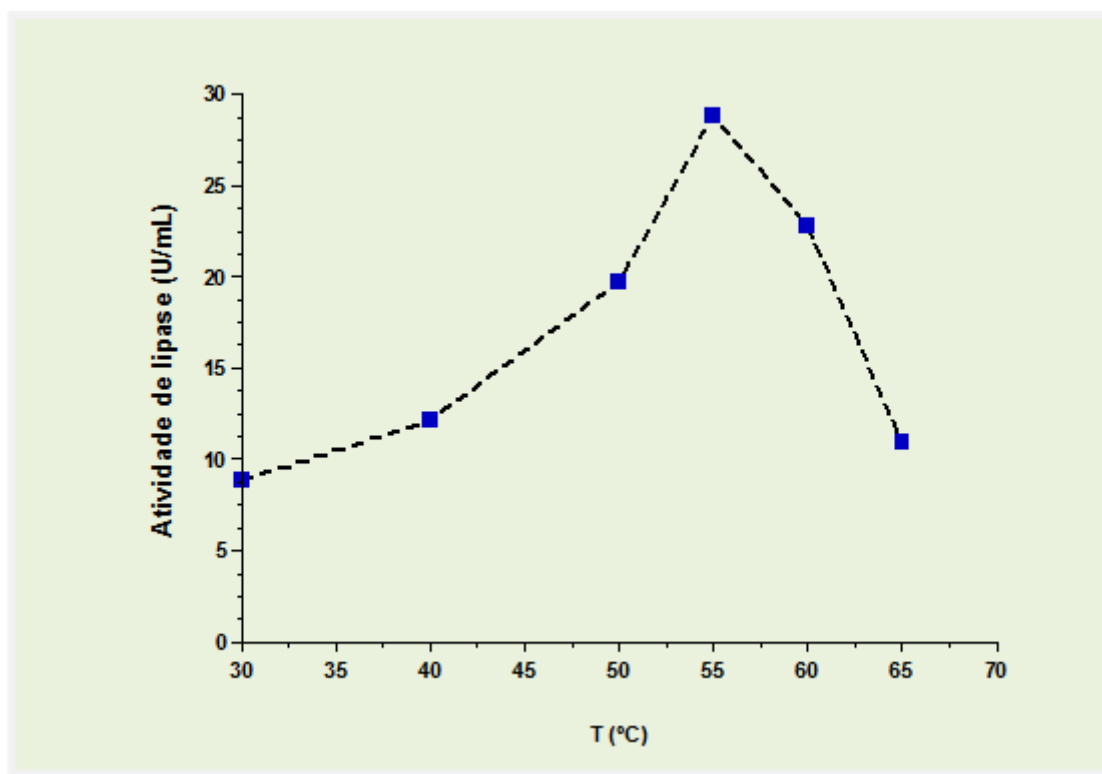
Determinação do pH ótimo para a atividade de lipase (U/mL)
produzida por *Botryosphaeria ribis* EC-01



APÊNDICE C

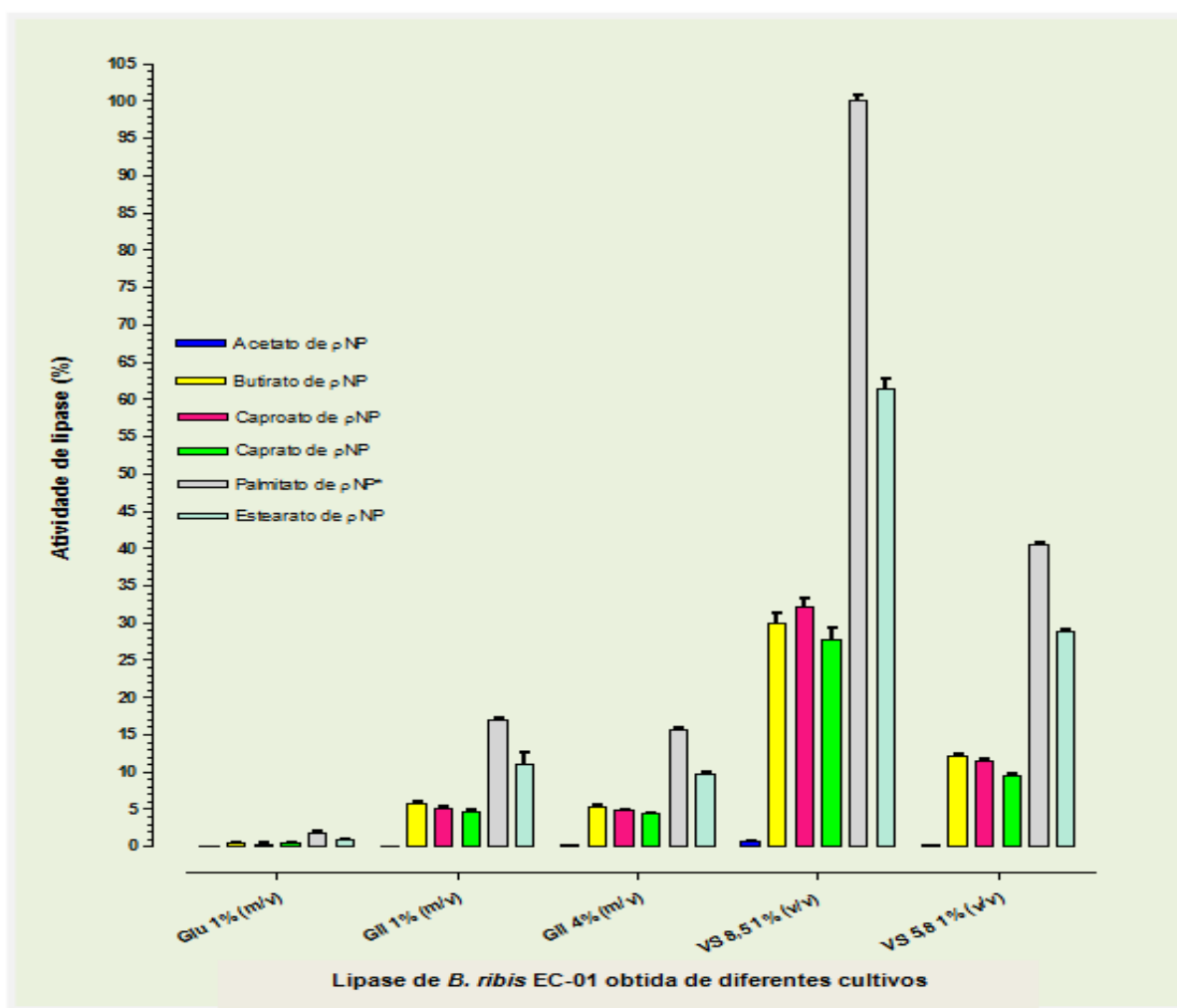
Determinação da temperatura (°C) ótima para a atividade de lipase (U/mL) produzida por *Botryosphaeria ribis* EC-01.

O tempo de incubação da reação foi de 2 minutos



APÊNDICE D

Perfil de atividade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 (obtida de diversos cultivos) frente à diferentes ésteres de *p*-nitrofenila



Perfil de atividade específica da lipase (%) de *B. ribis* EC-01 (obtida de diferentes cultivos) frente à diferentes triacilgliceróis e óleo de soja comercial. (*) Atividade de lipase no óleo de soja comercial foi admitida como 100%.

Glu 1% (m/v) = cultivo de 120 horas (180 rpm, 28 °C) contendo meio de Vogel acrescido de 1,0 % (m/v) de glicose;

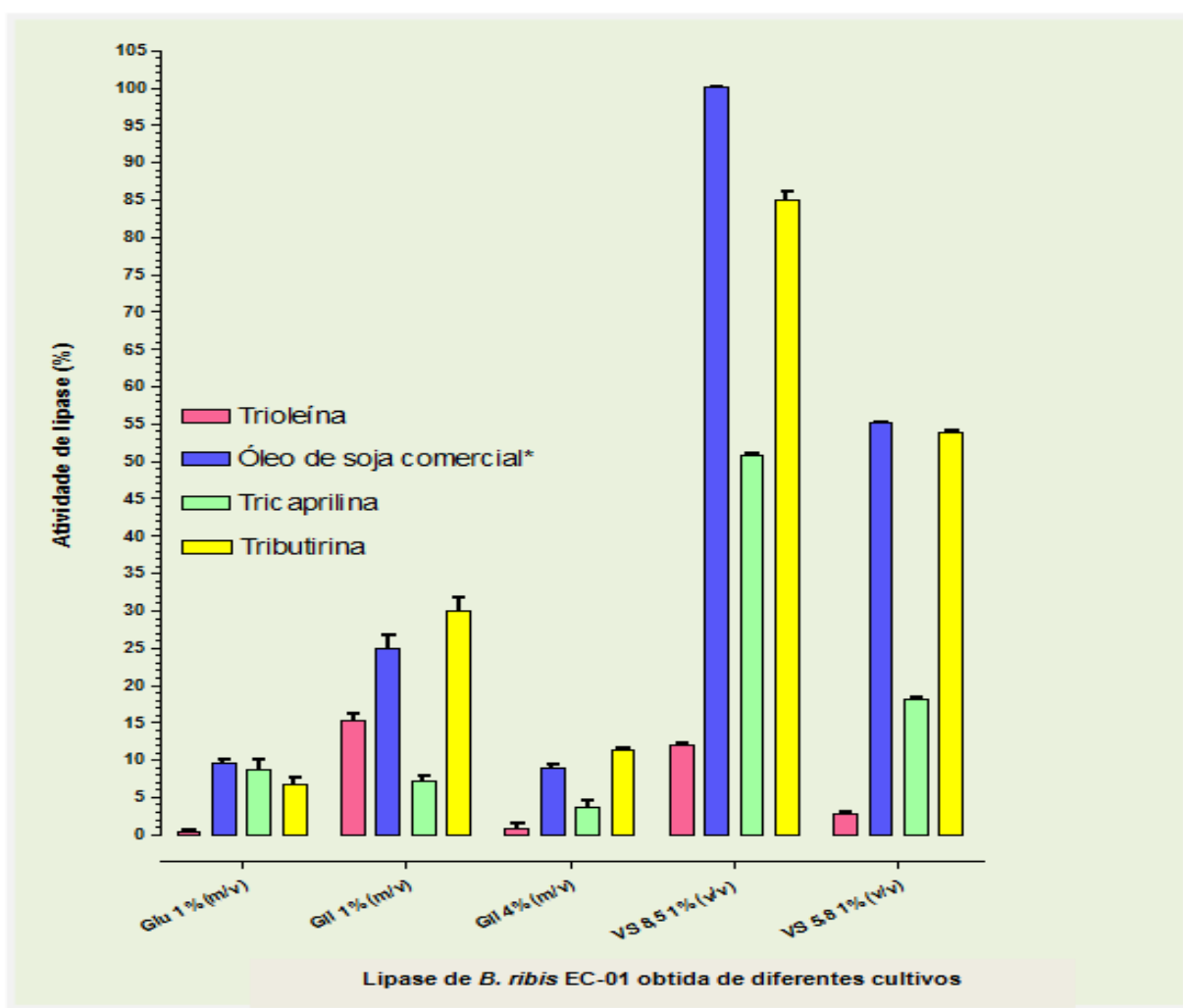
Gli 1% (m/v) ou Gli 4% (m/v) = cultivo de 120 horas (180 rpm, 28 °C) contendo meio de Vogel acrescido de 1,0 % ou 4,0% (m/v) de glicerol;

VS 8,5 1% (v/v) = Cultivo de 120 horas (180 rpm, 28 °C) contendo meio de Vogel acrescido de 1,0 % (v/v) de óleo de soja, sendo 8,5 o pH inicial do meio;

VS 5,8 1% (v/v) = Cultivo de 120 horas (180 rpm, 28 °C) contendo meio de Vogel acrescido de 1,0 % (v/v) de óleo de soja, sendo 5,8-6,0 o pH inicial do meio.

APÊNDICE E

Perfil de atividade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 (obtida de diversos cultivos) frente à diferentes triacilgliceróis ou óleo de soja comercial



Perfil de atividade específica da lipase (%) de *B. ribis* EC-01 (obtida de diferentes cultivos) frente à diferentes triacilgliceróis e óleo de soja comercial. (*) Atividade de lipase no óleo de soja comercial foi admitida como 100%.

Glc 1% (m/v) = cultivo de 120 horas (180 rpm, 28 °C) contendo meio de Vogel acrescido de 1,0 % (m/v) de glicose;

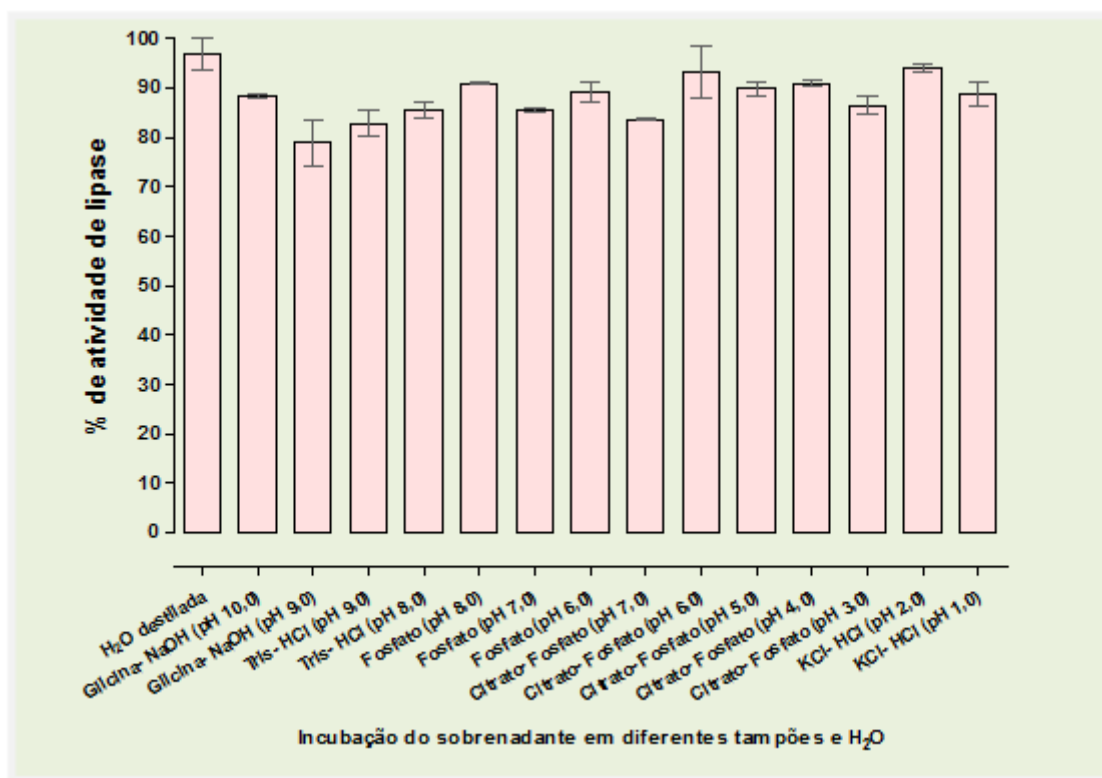
Gli 1% (m/v) ou Gli 4% (m/v) = cultivo de 120 horas (180 rpm, 28 °C) contendo meio de Vogel acrescido de 1,0 % ou 4,0% (m/v) de glicerol;

VS 8,5 1% (v/v) = Cultivo de 120 horas (180 rpm, 28 °C) contendo meio de Vogel acrescido de 1,0 % (v/v) de óleo de soja, sendo 8,5 o pH inicial do meio;

VS 5,8 1% (v/v) = Cultivo de 120 horas (180 rpm, 28 °C) contendo meio de Vogel acrescido de 1,0 % (v/v) de óleo de soja, sendo 5,8-6,0 o pH inicial do meio.

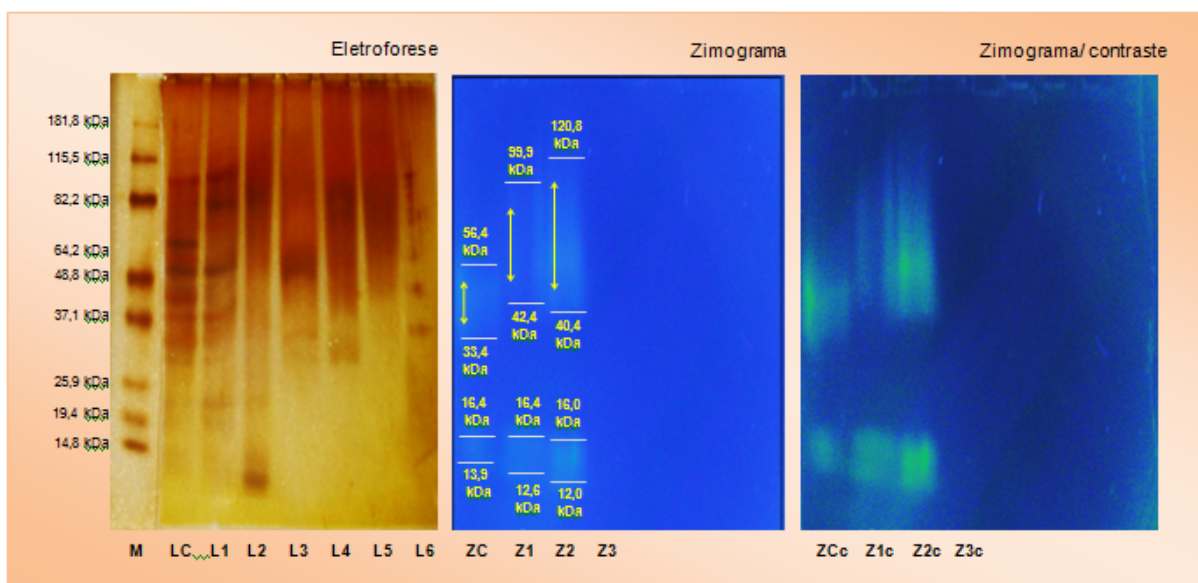
APÊNDICE F

Estabilidade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em diferentes valores de pH durante 1 hora de incubação à temperatura ambiente (30 °C)



APÊNDICE G

Padrão eletroforético e zimograma da lipase de *B. ribis* EC-01 (obtida de diferentes condições de cultivo)



Eletroforese (corada com nitrato de prata) e zimograma da lipase de *B. ribis* EC-01 (obtida de diversos cultivos). O zimograma foi observado em luz UV (302 nm).

M= marcador de massa molecular (kDa);

LC= VS 5,8 1,0 % (v/v): Cultivo de 120 horas (180 rpm, 28 °C), contendo meio de Vogel acrescido de 1,0 % (v/v) de óleo de soja e pH inicial 5,8-6,0;

L1= VS 8,5 1,0% (v/v): Cultivo de 120 horas (180 rpm, 28 °C) contendo meio de Vogel acrescido de 1,0 % (v/v) de óleo de soja e pH inicial 8,5;

L2= PF 8,5: Cultivo de acordo com o experimento 20 da Condição F do planejamento fatorial 2⁵ (melhor produção de lipase no pH inicial 8,5);

L3= PF 4,5: Cultivo de acordo com o experimento 13 da Condição F do planejamento fatorial 2⁵ (melhor produção de lipase no pH inicial 4,5);

L4= Gli 4,0 % (m/v): Cultivo de 120 horas (180 rpm, 28 °C) contendo meio de Vogel acrescido de 4,0 % (m/v) de glicerol;

L5= Gli 1,0% (m/v): Cultivo de 120 horas (180 rpm, 28 °C) contendo meio de Vogel acrescido de 1,0 % (m/v) de glicerol;

L6= Glc 1,0 % (m/v): Cultivo de 120 horas (180 rpm, 28 °C) contendo meio de Vogel acrescido de 1,0 % (m/v) de glucose;

ZC, Z1, Z2 e Z3= zimogramas de **LC, L1, L2 e L3**, respectivamente;

ZCc, Z1c, Z2c e Z3c= zimogramas com contraste de cor (tratamento de imagem) de **ZC, Z1, Z2 e Z3**, respectivamente.

APÊNDICE H

Influência do pH inicial 8,5 na produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em cultivos contendo como fonte de carbono o óleo de soja emulsificado ou não por Tween ou Triton X-100 (0,1%, m/v)

Influência do pH inicial 8,5 na produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01: avaliação da biomassa fúngica e do pH inicial e final dos cultivos

Fontes de carbono (%, m/v ou e v/v*)	Atividade lipase (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	pH inicial	pH final	Biomassa (g/L)
Soja* (0,5)	34,8 ± 8,60	93,55 ± 0,03	5,80	6,51 ± 0,07	9,10 ± 0,35
Soja* (0,5) - pH inicial 8,5	67,3 ± 9,88	157,24 ± 0,05	8,59	7,54 ± 0,04	11,28 ± 0,87
Soja* (1,0) + Tween 80 (0,1)	101,3 ± 2,40	**	5,88	7,02 ± 0,00	11,74 ± 0,02
Soja* (1,0) + Tween 80 (0,1) – pH inicial 8,5	97,5 ± 0,15	**	8,55	7,65 ± 0,09	10,76 ± 0,64
Soja* (1,0) + Triton X-100 (0,1)	105,6 ± 3,88	**	5,77	6,53 ± 0,10	7,82 ± 1,26
Soja* (1,0) + Triton X-100 (0,1) – pH inicial 8,5	40,6 ± 0,42	**	8,44	7,31 ± 0,29	6,30 ± 0,42

(**) **Proteína total:** não determinada, devido à interferência do Tween 80 e do Triton-X 100 no método de Hartree (1972).

APÊNDICE I

Respostas observadas para as Condições de misturas (A, B, C, D e E) das fontes de carbono glicerol e óleo de soja em cada planejamento fatorial fracionário 2^{5-1}

Condição A – Produção de lipase por *B. ribis* EC-01 em glicerol 6,0% (m/v) como fonte de carbono

Variáveis N° do Experimento	Variáveis					Respostas				
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	pH inicial	pH final	Lipase (U/mL)	Lipase (U/mg)	Biomassa (g/L)
1	-1	-1	-1	-1	+1	4,53	5,52	2,05	7,83	5,20
2	+1	-1	-1	-1	-1	8,51	7,43	1,97	15,55	7,48
3	-1	+1	-1	-1	-1	4,51	5,70	08,30	33,70	8,00
4	+1	+1	-1	-1	+1	8,48	7,29	7,63	54,11	6,00
5	-1	-1	+1	-1	-1	4,53	5,66	3,91	10,80	7,76
6	+1	-1	+1	-1	+1	8,50	8,17	0,01	0,08	4,18
7	-1	+1	+1	-1	+1	4,49	5,89	8,70	39,01	9,12
8	+1	+1	+1	-1	-1	8,54	7,60	1,03	9,00	3,60
9	-1	-1	-1	+1	-1	4,50	5,31	1,65	13,18	6,04
10	+1	-1	-1	+1	+1	8,52	8,58	0,01	0,06	3,71
11	-1	+1	-1	+1	+1	4,50	5,17	11,55	65,23	6,08
12	+1	+1	-1	+1	-1	8,50	7,38	4,97	25,82	5,28
13	-1	-1	+1	+1	+1	4,47	5,22	1,77	8,17	8,08
14	+1	-1	+1	+1	-1	8,51	7,68	0,03	0,35	3,08
15	-1	+1	+1	+1	-1	4,52	5,61	11,07	81,52	4,16
16	+1	+1	+1	+1	+1	8,46	7,94	2,02	16,72	5,36
17	0	0	0	0	0	6,53	6,50	6,53	28,18	7,72
18	0	0	0	0	0	6,49	6,60	6,95	15,66	9,16
19	0	0	0	0	0	6,50	6,57	6,93	7,61	7,24
20	-1	0	0	0	0	4,49	5,67	5,94	33,54	11,64
21	+1	0	0	0	0	8,52	8,35	0,08	0,44	5,43

X₁- pH inicial do meio de cultivo, X₂- tempo de cultivo, X₃- concentração de NH₄NO₃ (% m/v), X₄- concentração de KH₂PO₄ (% m/v), X₅- velocidade de rotação (interação de X₁X₂X₃X₄)

Condição B – Produção de lipase por *B. ribis* EC-01 em glicerol 4,5% (m/v) e óleo de soja 0,5% (v/v).

Variáveis N° do Experimento	Variáveis					Respostas				
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	pH inicial	pH final	Lipase (U/mL)	Lipase (U/mg)	Biomassa (g/L)
1	-1	-1	-1	-1	+1	4,51	4,02	34,03	110,45	11,40
2	+1	-1	-1	-1	-1	8,48	7,82	0,05	0,21	3,08
3	-1	+1	-1	-1	-1	4,49	6,37	45,57	136,52	8,44
4	+1	+1	-1	-1	+1	8,52	8,02	81,13	219,04	12,16
5	-1	-1	+1	-1	-1	4,48	5,57	7,96	20,41	6,32
6	+1	-1	+1	-1	+1	8,52	7,64	0,14	1,05	3,36
7	-1	+1	+1	-1	+1	4,46	3,87	68,58	322,73	12,96
8	+1	+1	+1	-1	-1	8,48	7,22	0,05	0,47	4,52
9	-1	-1	-1	+1	-1	4,55	5,23	0,02	0,22	2,48
10	+1	-1	-1	+1	+1	8,50	8,18	0,03	0,29	5,42
11	-1	+1	-1	+1	+1	4,51	5,94	70,92	197,33	7,96
12	+1	+1	-1	+1	-1	8,50	7,76	0,07	0,42	4,68
13	-1	-1	+1	+1	+1	4,48	4,84	19,50	71,56	7,12
14	+1	-1	+1	+1	-1	8,48	7,59	10,78	39,09	4,04
15	-1	+1	+1	+1	-1	4,51	3,84	38,03	216,82	8,16
16	+1	+1	+1	+1	+1	8,55	7,42	0,04	1,04	3,12
17	0	0	0	0	0	6,51	7,22	93,67	201,18	10,60
18	0	0	0	0	0	6,47	6,97	80,07	262,01	10,56
19	0	0	0	0	0	6,50	6,85	64,60	146,62	10,52
20	-1	0	0	0	0	4,50	3,63	26,50	178,93	12,08
21	+1	0	0	0	0	8,48	7,71	0,04	0,33	3,60

X₁- pH inicial do meio de cultivo, X₂- tempo de cultivo, X₃- concentração de NH₄NO₃ (% m/v), X₄- concentração de KH₂PO₄ (% m/v), X₅ - velocidade de rotação (interação de X₁X₂X₃X₄)

Condição C – Produção de lipase por *B. ribis* EC-01 em glicerol 3,0% (m/v) e óleo de soja 1,0% (v/v).

Variáveis N° do Experimento	Variáveis					Respostas				
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	pH inicial	pH final	Lipase (U/mL)	Lipase (U/mg)	Biomassa (g/L)
1	-1	-1	-1	-1	+1	4,50	4,22	16,87	61,77	5,12
2	+1	-1	-1	-1	-1	8,55	6,92	0,11	0,82	4,68
3	-1	+1	-1	-1	-1	4,51	3,32	44,77	352,22	11,60
4	+1	+1	-1	-1	+1	8,53	7,99	96,92	241,45	8,12
5	-1	-1	+1	-1	-1	4,51	5,34	8,63	40,14	7,76
6	+1	-1	+1	-1	+1	8,51	7,79	0,23	1,25	4,28
7	-1	+1	+1	-1	+1	4,54	4,54	84,60	139,63	6,80
8	+1	+1	+1	-1	-1	8,47	6,99	0,16	0,95	8,44
9	-1	-1	-1	+1	-1	4,49	5,28	9,94	46,40	8,04
10	+1	-1	-1	+1	+1	8,50	8,31	0,22	1,17	6,63
11	-1	+1	-1	+1	+1	4,53	6,13	48,40	125,29	10,84
12	+1	+1	-1	+1	-1	8,54	6,99	4,93	8,37	9,76
13	-1	-1	+1	+1	+1	4,47	5,03	15,40	58,76	9,60
14	+1	-1	+1	+1	-1	8,47	7,04	0,04	0,49	3,64
15	-1	+1	+1	+1	-1	4,55	3,69	30,80	269,23	10,40
16	+1	+1	+1	+1	+1	8,49	7,06	0,16	5,96	3,36
17	0	0	0	0	0	6,51	7,33	88,25	233,77	9,64
18	0	0	0	0	0	6,46	7,37	83,83	188,04	11,92
19	0	0	0	0	0	6,49	7,43	72,33	162,61	7,76
20	-1	0	0	0	0	4,51	3,54	27,93	163,05	8,76
21	+1	0	0	0	0	8,47	7,96	0,01	0,06	1,56

X₁- pH inicial do meio de cultivo, X₂- tempo de cultivo, X₃- concentração de NH₄NO₃ (% m/v), X₄- concentração de KH₂PO₄ (% m/v), X₅ - velocidade de rotação (interação de X₁X₂X₃X₄)

Condição D – Produção de lipase por *B. ribis* EC-01 em glicerol 1,5% (m/v) e óleo de soja 1,5% (v/v).

Variáveis N° do Experimento	Variáveis					Respostas				
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	pH inicial	pH final	Lipase (U/mL)	Lipase (U/mg)	Biomassa (g/L)
1	-1	-1	-1	-1	+1	4,50	5,51	9,49	83,17	7,92
2	+1	-1	-1	-1	-1	8,51	6,95	0,20	1,78	4,44
3	-1	+1	-1	-1	-1	4,48	6,17	50,37	131,09	11,24
4	+1	+1	-1	-1	+1	8,50	8,54	85,80	178,23	11,76
5	-1	-1	+1	-1	-1	4,48	5,81	12,37	80,31	7,92
6	+1	-1	+1	-1	+1	8,52	7,50	0,20	1,88	6,72
7	-1	+1	+1	-1	+1	4,53	5,01	76,00	239,37	9,96
8	+1	+1	+1	-1	-1	8,48	6,67	0,40	1,93	7,68
9	-1	-1	-1	+1	-1	4,50	5,80	8,20	57,79	5,08
10	+1	-1	-1	+1	+1	8,56	7,64	0,08	0,87	5,96
11	-1	+1	-1	+1	+1	4,51	6,12	59,20	112,16	9,88
12	+1	+1	-1	+1	-1	8,48	6,80	4,35	15,74	6,20
13	-1	-1	+1	+1	+1	4,47	5,50	11,43	77,97	7,56
14	+1	-1	+1	+1	-1	8,49	7,23	0,10	1,03	3,72
15	-1	+1	+1	+1	-1	4,50	3,58	44,03	44,24	6,40
16	+1	+1	+1	+1	+1	8,48	8,41	36,80	107,26	8,88
17	0	0	0	0	0	6,52	7,51	72,27	198,65	11,28
18	0	0	0	0	0	6,48	7,39	72,40	201,78	8,24
19	0	0	0	0	0	6,49	7,06	55,40	129,08	11,52
20	-1	0	0	0	0	4,52	3,29	52,60	153,58	10,96
21	+1	0	0	0	0	8,50	6,98	0,09	0,48	4,52

X₁- pH inicial do meio de cultivo, X₂- tempo de cultivo, X₃- concentração de NH₄NO₃ (% m/v), X₄- concentração de KH₂PO₄ (% m/v), X₅- velocidade de rotação (interação de X₁X₂X₃X₄)

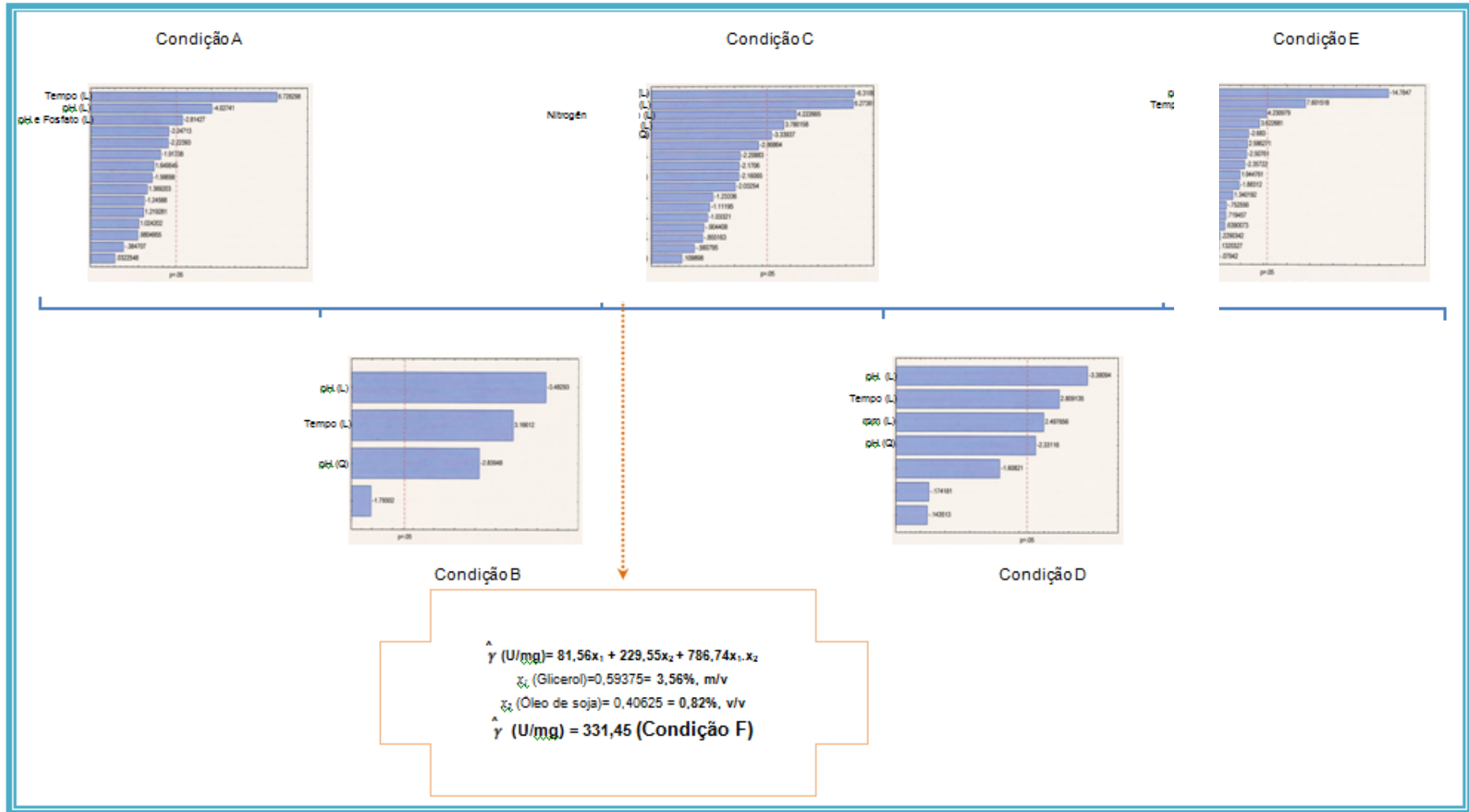
Condição E – Produção de lipase por *B. ribis* EC-01 em óleo de soja 2,0% (v/v).

Variáveis N° do Experimento	Variáveis					Respostas				
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	pH inicial	pH final	Lipase (U/mL)	Lipase (U/mg)	Biomassa (g/L)
1	-1	-1	-1	-1	+1	4,50	3,17	20,50	119,19	8,96
2	+1	-1	-1	-1	-1	8,50	7,25	0,11	0,87	5,80
3	-1	+1	-1	-1	-1	4,52	5,10	46,17	159,53	10,28
4	+1	+1	-1	-1	+1	8,55	8,58	24,20	90,71	10,24
5	-1	-1	+1	-1	-1	4,53	5,98	8,82	76,80	8,68
6	+1	-1	+1	-1	+1	8,52	7,30	0,19	1,88	2,28
7	-1	+1	+1	-1	+1	4,45	4,04	136,70	229,55	11,00
8	+1	+1	+1	-1	-1	8,51	6,76	0,16	1,56	7,44
9	-1	-1	-1	+1	-1	4,51	5,80	8,65	53,56	3,80
10	+1	-1	-1	+1	+1	8,51	7,72	0,10	0,94	3,42
11	-1	+1	-1	+1	+1	4,50	6,12	69,80	132,00	11,16
12	+1	+1	-1	+1	-1	8,53	7,84	0,05	0,444	3,32
13	-1	-1	+1	+1	+1	4,53	3,77	18,10	119,24	8,24
14	+1	-1	+1	+1	-1	8,56	7,06	0,03	0,24	1,64
15	-1	+1	+1	+1	-1	4,52	3,61	38,73	226,11	9,56
16	+1	+1	+1	+1	+1	8,50	8,53	27,10	92,18	9,32
17	0	0	0	0	0	6,50	7,30	74,80	115,08	9,52
18	0	0	0	0	0	6,47	7,32	62,73	125,71	8,12
19	0	0	0	0	0	6,49	6,65	59,93	89,89	8,64
20	-1	0	0	0	0	4,51	4,68	96,67	227,46	8,44
21	+1	0	0	0	0	8,48	7,30	0,14	0,69	5,12

X₁- pH inicial do meio de cultivo, X₂- tempo de cultivo, X₃- concentração de NH₄NO₃ (% m/v), X₄- concentração de KH₂PO₄ (% m/v), X₅- velocidade de rotação (interação de X₁X₂X₃X₄)

APÊNDICE J

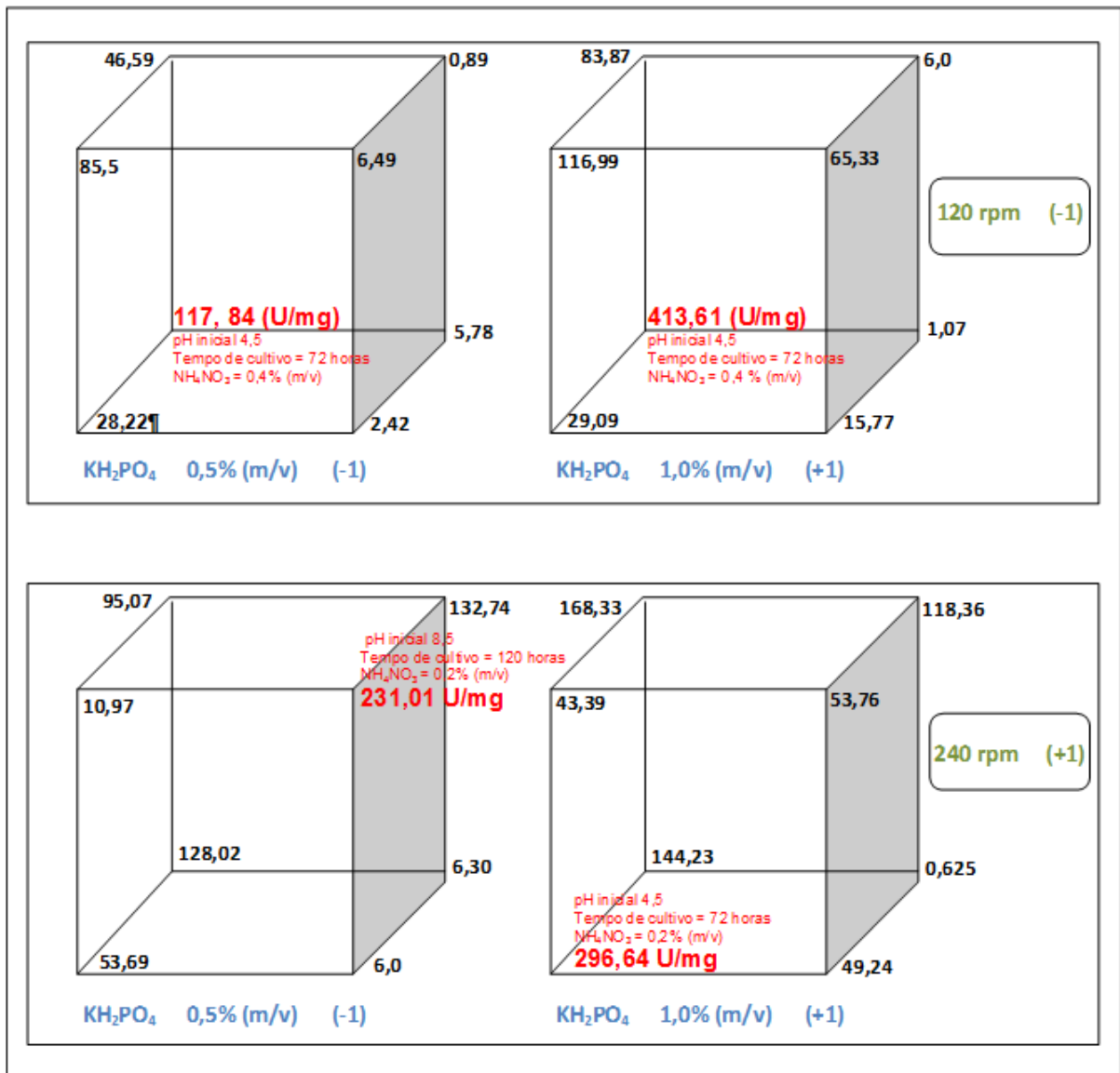
Observação dos efeitos das variáveis através de gráficos de Pareto para a produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01:
planejamento fatorial fracionário (2^{5-1}) para cada Condição de mistura (A, B, C, D e E) das fontes de carbono glicerol e óleo de soja



Observação dos efeitos das variáveis através de gráficos de Pareto para a produção de lipase por *B. ribis* EC-01. Planejamento fatorial fracionário (2^{5-1}). Termos estatisticamente significativos: valor de $p < 0,05$ (95% de confiança). **Condição A, B, C, D e E**: misturas das fontes de carbono glicerol (% m/v) e óleo de soja (% v/v) (Tabela 4.6). **Condição F**: uma nova mistura das fontes de carbono glicerol e óleo de soja (calculada). X_1 - pH inicial do meio de cultivo, X_2 - tempo de cultivo, X_3 - concentração de NH_4NO_3 (% m/v), X_4 - concentração de KH_2PO_4 (% m/v), X_5 - velocidade de rotação (interação de $X_1X_2X_3X_4$). L= Efeito Linear e Q= Efeito Quadrático

APÊNDICE K

Planejamento fatorial 2^5 para a Condição de mistura F (glicerol (3,56%, m/v) e óleo de soja (0,8%, v/v)). Respostas observadas através de 4 gráficos cúbicos



Diagramas geométricos das respostas (atividade específica de lipase (U/mg produzida por *B. ribis* EC-011)) oriundas do planejamento fatorial 2^5 e observadas através de 4 planejamentos 2^3 (4 gráficos cúbicos). Em vermelho estão destacadas as maiores atividades de lipase.

ANEXOS

ANEXO A

Dosagem de carbono, nitrogênio e fósforo total do óleo de soja Liza (Lote 090035RV
– Cargil Agrícola S/A) utilizado neste trabalho

Dosagem de carbono, nitrogênio e fósforo total* do óleo de soja Liza (Lote 090035RV)

Carbono^a	780,00 g/kg
Nitrogênio^b	0,96 g/kg
Fósforo^c	0,00 g/kg
Umidade^d	0,00 %

Análise realizada pelo Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR)

Laboratório de Solos e Tecido Vegetal – Londrina – PR

* Dosagem utilizada nos cálculos das razões C/N, C/P e N/P do Artigo B (item 5.2.2)

^a WALKLEY, A.; BLACK, I.A. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Science**, v.37, p.29-38, 1934.

^{b,c} A extração foi realizada por digestão sulfúrica (Kjeldahl) e a determinação colorimétrica por “Verde de Salicílico”^b e por “Azul de molibdato”^c. **Fonte:** Laboratório de Solos e Tecido Vegetal (IAPAR) – Londrina-PR

^d 105 °C.

Fonte: Laboratório de Solos e Tecido Vegetal (IAPAR) – Londrina-PR

ANEXO B

Resumo enviado ao BioMicroWorld 2007 – Sevilha/Espanha. II International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology

***Botryosphaeria* spp. as sources of lipases. Biochemical and physiological parameters of lipase production by a *Botryosphaeria ribis* strain cultured on vegetable oils and glycerol**

A. M. Barbosa^{*},^{6,3}, J. M. Messias¹, B. Z. da Costa¹, A. da Silva Filho¹, M. I. Rezende¹, V. M. G. de Lima⁷, R. F. H. Dekker⁸

Fungi of the genus *Botryosphaeria* are endophytic phytopathogens causing destructive damage in host plants of commercial and economic importance. Besides secreting enzymes associated with the degradation of the plant cell wall including pectinases and laccase, and an exopolysaccharide, botryosphaeran, that is a causal agent of pathogenesis (dieback, wilting and gummosis diseases), there are no reports in the scientific literature on lipases (E.C.3.1.1.3) of *Botryosphaeria* spp. Lipases as hydrolases of triacylglycerols find industrial applications in foods, detergents, cosmetics, and as esterases in biotransformation reactions for organic synthesis of pharmacologically-active drugs. Presently, there is much interest in the application of appropriate lipases in biodiesel production from vegetable seed oils. In this work, 8 fungal isolates of the genus *Botryosphaeria*: *B. ribis*, *B. rhodina* MAMB-05 (isolated from an eucalypt), and six *Lasiodiplodia theobromae* (anamorph of *B. rhodina*) isolated from tropical plants of northern Brazil (fruits: graviola, mango, pinha; eggplant; leaf of mango tree, and currupixá wood from the Amazon), were evaluated for lipase production. These isolates were cultivated on Vogel minimum salts medium containing either glycerol, or each of 8 different vegetable oils (canola, cotton, maize, olive, sesame, soybean, sunflower, and babaçu (palm nut from the Amazon) at 1 % (v/v) as sole carbon sources at 28 °C (180 rpm) for 5 days. Lipase activity was assayed using *p*-nitrophenyl-palmitate as substrate at pH 8.0 and 30 °C (5 min). The unit of lipase is the amount of enzyme liberating 1 µmol *p*-nitrophenol per min/mL. Optimal lipase activity occurred at pH 8.0 and 55 °C, and the effects of

⁶ Universidade Estadual de Londrina, Depto. de Bioquímica e Biotecnologia, CEP 86051-990, Londrina-PR, Brasil Corresponding author: e-mail: aneli@uel.br

⁷ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, CEP 19806-900, Assis-SP, Brasil

⁸ Universidad de Castilla - La Mancha, *IRICA*, 13071 Ciudad Real, España

pH (2-9) and temperature (30-65 °C) on enzyme activity are presented. The effects of various components in the nutrient medium with soybean oil as substrate on lipase production were also examined. They included several nitrogen sources (NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, yeast extract, bacteriological peptone, urea, corn steep liquor), all at 0.2% (w/v); NH_4Cl and NaNO_3 at 0.4% (w/v); as well as phosphates (NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ at 0.5% (w/v). Initial experiments on glucose (1 %) as sole C source by *B. ribis* resulted in maximal lipase activity of 0.6 U/mL (specific activity 4 U/mg) and demonstrated that lipase was produced constitutively. This was also confirmed with fructose and sucrose (1.0 %, w/v) as carbon sources. With the different vegetable oils as C sources, all *Botryosphaeria* spp. produced lipase activity. *B. ribis* was distinguished as being highly lipolytic and presented the highest lipase titre (3.9 U/mL) compared to the other *Botryosphaeria* spp., and hence was selected for further study. A growth profile for *B. ribis* on soybean oil as substrate was conducted over 168 h with samples removed periodically at 24-h intervals for lipase assay. Experiments were also conducted at different initial pH (range 2 - 9) with soybean oil as substrate to assess enzyme titres, and were interrupted on the 5th day of growth. Nitrogen and phosphate sources played an important role in increasing lipolytic activity, with NH_4NO_3 and Na_2HPO_4 producing highest enzyme titres (32 and 41 U/mL, resp). The growth profile showed that lipase production was highest on day 4 (49 U/mL), however, the best specific lipase activity was registered on day 3 (166 U/mg). Initial pH of the culture medium benefited enzyme production. At initial pH 8.5, an enzyme titre of 146 U/mL (specific activity 632 U/mg) resulted. The results presented here demonstrate that soybean is a good and cheap substrate for the production of lipases by *Botryosphaeria ribis*. Given the availability of soybean oil in Brazil with trends to increase its production for biodiesel, lipase can play an important role in its production. New research on the optimisation of the production, properties and applications of lipases by *Botryosphaeria* spp. will contribute to the development of new biotechnological processes. Acknowledgements: CNPq (Brazil) Project N° 474340/2006-6

Keywords lipase. *Botryosphaeria* spp.

ANEXO C

Resumo enviado ao ENZITEC 2008 – Rio de Janeiro/Brasil VIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática”

LIPASES FROM *BOTRYOSPHAERIA RIBIS* GROWN ON SOYBEAN OIL: PROPERTIES AND SUBSTRATE SPECIFICITIES

Josana M. Messias¹, Bruna Z. da Costa¹, Virgínia C. A. Falcão¹, M. Inês Rezende¹, Valéria M. G. Lima², Robert F. H. Dekker³, Aneli M. Barbosa^{1*}

Keywords: Lipase. Stability. *Botryosphaeria ribis*. Glycerol. soybean oil.

Palavras-chave: Lipase. Estabilidade. *Botryosphaeria ribis*. Glicerol. Óleo de soja.

Introduction and Experimental Proceedings

Nine isolates of *Botryosphaeria* spp. were screened for lipases by cultivation on eight vegetable oils and glycerol as sole carbon sources. An isolate of *Botryosphaeria ribis* EC-01 from an eucalypt tree in São Paulo state-Brasil was found to be the best producer of lipases. Some fermentation parameters to increase lipase synthesis were examined, and soybean oil was chosen as best carbon source, as well as NH₄NO₃ and KH₂PO₄ as nitrogen and phosphate sources, resp. The objective of this work was to evaluate the specificity of this lipase against several substrates, as well as to determine its stabilities to thermal, pH, organic solvents and detergents.

The submerged cultures were developed on liquid medium containing Vogel minimal salts medium¹ (VMSM), soybean oil 1% (v/v) for 5 days (180 rpm, 28 °C). The cell-free extracellular fluid (ECF) contained lipase activity.

¹ Universidade Estadual de Londrina, BBTEC–CCE, Londrina, PR - BRASIL

² Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita” Assis, SP - BRASIL

³ Universidad de Castilla - La Mancha - IRICA, Ciudad Real - ESPAÑA

Lipases were assayed by colorimetry² using *p*-nitrophenyl-fatty acyl esters, and titrimetry³ using different triacylglycerols and soybean oil as substrates. The unit of lipase was defined as 1 μmol product (*p*-nitrophenol or fatty acid) liberated $\text{min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ of enzyme solution under the conditions of assay. The thermal stability was determined by exposing the ECF to temperatures of 30° to 85 °C for 24 h, and pH stabilities (from pH 1.0 to 10.0) at 25 °C and 1 h incubation. Lipase was incubated with solvents (acetone, butanol, ethanol, iso-propanol, methanol, hexane, iso-octane and toluene) for 1 h, and also in the detergents (Tween 80, Triton X-100 and SDS⁴). A zymogram method employing SDS-PAG- electrophoresis⁵ was used to detect lipases using methyl-umbelliferyl butyrate (MUB) as substrate^{6,7}. The gels were also developed with AgNO_3 ⁸.

Results and Conclusions

B. ribis hydrolysed all *p*-NP-fatty acyl esters evaluated (acetate, butyrate, caproate, palmitate, stearate) as well as the triglycerides (triolein, tributyrin, tricaprillin) and soybean oil. Highest lipase specific activity was on *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP) (80.2 U/mg), detected by the colorimetry, and on soybean oil (118.4 U/mg) and tributyrin (115.5 U/mg) by the titrimetric method. The enzyme retained 90 % of its original activity after 24 h at 30 to 55 °C. The lipase was stable (85 % activity retention) in the pH range of 1.0 to 10 after 1 h incubation at 30 ± 2 °C. In the presence of 99 % of solvents (acetone, methanol, ethanol, and isopropanol) the *B. ribis* lipase retained around 20 to 30 % of its original activity, and 68 % in iso-octane. The enzyme maintained 100 % activity in the presence of the detergents Tween 80, Triton X-100 and SDS at a concentration of 0.01 % (w/v). Lipase zymograms developed following SDS-PAG electrophoresis with methyl-umbelliferyl butyrate showed two well-separated blue fluorescent bands (UV 302 nm), which arose from hydrolysis of MUF-butyrate. The first band showed a MW between 56.4 and 33.4 kDa, while the second was between 16.4 and 13.9 kDa. *Botryosphaeria ribis* lipases appear to be a promising enzyme for future biotechnological applications.

REFERENCES

1. VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbial Genetics Bulletin**, v.13, p.42-43, 1956.
2. 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, p.663-670, 1979.
3. STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*, **Journal of Bacteriology**, v.168, p.1070, 1986.
4. LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; BARATTI, J. C.; FILIPPIS, I.; FONTANA, J. D. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.31, p.53-61, 2004.
5. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
6. PRIM, N.; SÁNCHEZ, M.; RUIZ, C.; PASTOR, J. F. I.; DIAZ, P. Use of methylumbeliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.22, p.339-346, 2003.
7. DIAZ, P.; PRIM, N.; PASTOR, J. F. I. Direct fluorescence-based lipase activity assay. **Biotechniques**, v.27, p.696-698, 1999.
8. BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins: RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

[*aneli@uel.br](mailto:aneli@uel.br)

Acknowledgments: To CNPq Project 474340/2006-6

ANEXO D

Resumo enviado ao "VI Congresso Latino Americano de Micologia"- Mar del Plata/Argentina - 2008 (Apresentação oral)

Mejora de la producción de lipasa por *Botryosphaeria ribis* EC-01: Cultivo en aceite de soja y glicerol.

Improvement in lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01: Cultivation on soybean oil and glycerol.

Messias^{*1} JM; Costa¹ BZ; Falcão^{*1} VCA; Rezende¹ MI; Lima² VMG; Dekker³ RFH; Barbosa¹ AM; Scarminio¹ IS.

Fungi of the genus *Botryosphaeria* are good producers of laccases, exopolysaccharides and lipases. Lipases are of interest in processing foods and in the production of biodiesel and biosurfactants. A 2⁵ factorial design was used to examine the influence of different growth parameters in a mixture of glycerol and soybean oil as carbon sources with the objective of enhancing lipase titres by *B. ribis* EC-01. Lipolytic activity was determined by colorimetry (hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate) and titration (pH STAT). Growth conditions: 72 h, initial pH 4.5, 120 rpm shaking rate, NH₄NO₃ (4 g/l) and KH₂PO₄ (10 g/l), were the optimum values for a nutrient mixture comprising 0.8% (v/v) soybean oil and 3.6% (w/v) glycerol. Under these conditions, the specific activity of lipase reached was 414 U/mg. At the 95% confidence level, there was interaction among 5 variables, and initial pH and its interaction with time of growth were the most significant. Soybean oil (abundant in Brazil) and glycerol (by-product of biodiesel production) are promising feedstocks for the production of lipases by *B. ribis*.

Acknowledgments: CNPq Project 474340/2006-6

¹ Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR/BRAZIL.

² Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita", Assis, SP/BRAZIL.

³ Universidad de Castilla - La Mancha, IRICA, Ciudad Real, ESPAÑA. e-mail: aneli@uel.br

ANEXO E

Guia para autores do periódico Enzyme and Microbial Technology

ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY

Guide for Authors

Biotechnology Research and Reviews

Enzyme and Microbial Technology is an international, peer-reviewed journal publishing original research and reviews on basic and applied aspects of the use of enzymes and microorganisms, including bacteria, fungi, algae, protozoa, viruses, animal cells and plant cells.

Submission of Manuscripts

Authors are requested to submit their manuscripts electronically, by using the EES online submission tool at <http://ees.elsevier.com/enzmictec>.

After registration, authors will be asked to upload their article, an extra copy of the abstract, and associated artwork. The submission tool will generate a PDF file to be used for the reviewing process. The submission tool generates an automatic reply and a manuscript number will be generated for future correspondence.

A cover letter must be submitted on line by authors together with the manuscript. The cover letter must address the following points: 1) all authors agree to submit the work to EMT, 2) the work has not been published/submitted or being submitted to another journal, 3) the novelty and significant contribution of the

submitted work must be briefly described, 4) the transfer of copyright from the author to the publisher, 5) suggestions for reviewers.

The primary criteria for judging the acceptability of a manuscript are its scientific and biotechnological significance and its novelty. Upon receipt, submissions are initially screened by the Editors and the Advisory Board, and manuscripts lacking in these respects will be declined, even if the experimental work appears to be technically sound. After initial screening, all submissions are reviewed by referees whose names are not normally disclosed to authors. On acceptance for publication papers are subject to editorial amendment.

Authors are invited to provide the names, addresses, phone numbers and e-mail addresses of up to six potential reviewers. It is not appropriate to nominate individuals that have had any input into the manuscripts submitted or any recent collaboration with the authors. The Editors may or may not take these suggestions into account during the reviewing process.

Manuscripts which report isolation, purification, immobilization or utilization of organisms or enzymes which are already well-described in the literature are not suitable for publication in EMT, unless their primary purpose is to report significant new findings or approaches which are of broad biotechnological importance. Similarly, manuscripts which report optimization studies on well-established processes are inappropriate. EMT does not accept papers dealing with mathematical modeling unless they report significant, new experimental data.

Format and type of manuscripts

Contributions are classified as *Research Papers*, *Rapid Communications* or *Reviews*.

Research Papers should be a record of significant, original research and should not normally exceed 6000 words in length.

Rapid Communications should be short accounts of research of unusual urgency and significance and should not exceed a total of eight manuscript pages, including tables and figures. A letter stating the reasons for wishing the submission to be considered as a Rapid Communication must accompany the manuscript. At the discretion of the Editors, manuscripts in this category will receive accelerated handling. Authors are urged to ensure careful adherence to the guidelines for the preparation of manuscripts set out below since manuscripts requiring extensive editing or modification cannot be considered for expedited handling. *Reviews* are normally invited by the Editors but unsolicited review articles of up to 10,000 words are welcome. Authors should send a brief outline to one of the Editors before the manuscript is drafted.

The manuscript must be accompanied by copies of all relevant papers published elsewhere by the authors and by copies of relevant manuscripts that are in press or under editorial consideration. If any tables or illustrations have been published elsewhere the editorial office must be informed so that permission to reproduce can be obtained from the original publishers.

Manuscripts should be typed in double spacing throughout with a margin of 30mm at the top and bottom on both sides. Papers must be arranged in the following order of presentation: title of paper; names of the authors; address of the place at which the work was carried out; an abbreviated title for use as a running headline; a self-contained synopsis of the paper (100-200 words in length); body of the manuscript; tables, each on a separate page; captions to figures; figures, each on a separate page. Submissions not conforming to these guidelines may be returned to the authors.

Language Polishing

Authors who require information about language editing and copyediting services pre-and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/locate/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by

outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Illustrations

It is the author's responsibility to provide artwork for all illustrations, both line and halftone.

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures than Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.

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 colour figures to "grey scale" (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white figures corresponding to all the colour illustrations.

Each figure must be accompanied by a caption, which consists of the title of the figure and sufficient explanatory details to make the figure easily understood.

Tables

Tables should be submitted on separate sheets together with a suitable caption at the top of each table. Column headings should be kept as brief as possible, and units of measure indicated in parentheses. Footnotes to tables should be placed at the bottom of the table to which they refer.

REFERENCES

Number all references to the literature in a single sequence in the order in which they appear in the text, using Arabic numerals. Full citation should be given for all authors. Titles of articles, as well as titles of chapters in books, should be included. Abbreviate journal titles in accordance with Bibliographic Guide for Editors and Authors (American Chemical Society). References should take the following form:

1. Rijken DC, Hoylaerts J, Collen D. Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissuetype) plasminogen activator. *J Biol Chem* 1982;257:2920-2925
2. Thomas K, Gimenez-Gallego G, DiSalvo J, Linemeyer D, Kelly L, Menke J, Mellin T, Gusch R. Structure and activities of acidic fibroblast growth factor. In: *Angiogenesis Mechanisms and Pathobiology* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1987, 9-12

Units, Abbreviations and Nomenclature

Si units should be used: the foot-pound-second (fps) or other equivalent should be given in parentheses afterwards if necessary. On graphs, if values are recorded in non-Si units then additional scales in SI units should be used. If a large number of symbols is used, it is helpful if authors submit a list of these symbols and their meanings. Biochemical nomenclature should conform to that recommended by the IUPAC-IUB Commission, and enzymes should be given their EC numbers and systematic names.

Citations in the 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 allowed in the reference list, but may be mentioned in the text. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for (at least on-line) publication.

Citing and listing of Web references. As a minimum, the full URL should be given. 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.

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.

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] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2000;163:51-9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 3rd ed. New York: Macmillan; 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 1999, p. 281-304

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by "et al." For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical

Journals" (J Am Med Assoc 1997;277:927-934) (see also http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html)

Proofs

One set of page proofs in PDF format 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). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return 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. Therefore, it is important to ensure that all of your 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.

Authors can keep track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature of Elsevier's Author Gateway.

Special Subject Repositories

Certain repositories such as PubMed Central ("PMC") are authorized under special arrangement with Elsevier to process and post certain articles such as those funded by the National Institutes of Health under its Public Access policy (see <http://www.elsevier.com> for more detail on our policy).

Articles accepted for publication in an Elsevier journal from authors who have indicated that the underlying research reported in their articles was supported by an NIH grant will be sent by Elsevier to PMC for public access posting 12 months after final publication. The version of the article provided by Elsevier will include peer-review comments incorporated by the author into the article. Because the NIH "Public Access" policy is voluntary, authors may elect not to deposit such articles in PMC. If you wish to "opt out" and not deposit to PMC, you may indicate this by sending an e-mail to <mailto:NIHauthorrequest@elsevier.com>.

Reprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. 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. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Page charges are not levied by the journal.

ANEXO F

Guia para autores do periódico Process Biochemistry

PROCESS BIOCHEMISTRY

Guide for Authors

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

Submission of manuscripts

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

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

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

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

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

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

Format and type of manuscripts

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

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

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

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

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

Each paper should be provided with an abstract of 100-150 words for Short Communications and 150-200 words for Full Length Articles and Reviews, reporting concisely on the purposes and results of the paper, and also six keywords. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

The SI system should be used for all scientific and laboratory data: if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10⁹ in America, 10¹² in Europe) is ambiguous and should not be used.

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and / should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Footnotes should be avoided especially if they contain information which could equally well be included in the text. The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

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

References

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

- [1] Hsieh C, Hsu TH, Yang FC. Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (CCRC36021) by reusing thin stillage. *Process Biochem* 2005;40:909-916.
- [2] Stephanopoulos GN, Aristidou AA, Nielsen JE. *Metabolic engineering: principles and methodologies*. New York: Academic Press; 1998. p. 494
- [3] Zhong JJ, Yoshida T. Rheological characteristics of suspended cultures of *Perilla frutescens* and their implications in bioreactor operation for anthocyanin production. In: Ryu DDY, Furusaki S editors. *Advances in Plant Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier Science; 1994. p. 255-279.
- [4] Lima R, Salcedo, RL. An optimized strategy for equation-oriented global optimization. In: Grievink J, Schijndel JV. editors. *10th European Symposium on Computer Aided Chemical Engineering*. New York: Academic Press; 2002. p. 913-918.
- [5] Curtin CD. *Towards molecular bioprocessing as a tool to enhance production of anthocyanins in Vitis vinifera L. cell suspension culture*. Australia: Flinders University; Ph.D. thesis; 2004. p.250.
- [6] Snow-Brand-Milk-Prod. Lysozyme purification by affinity chromatography on crosslink chitosan sulfate. *Jpn. Patent*. JP 05260-966. 92.03.24.
- [7] Enfors SO, editor. *Physiological stress responses in bioprocesses*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. vol. 89. Berlin: Springer; 2004. p. 244.
- [8] Schweder T, Hecker M. Monitoring of stress response, In: Enfors SO, editor. *Physiological stress responses in bioprocesses*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* vol. 89. Berlin: Springer; 2004. p. 47-71.

Language Polishing

For authors, who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission, please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorhome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy", see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding (with the NIH award number, as well as the name and e-mail address of the Prime Investigator) and that you intend to respond to the NIH request.

Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after the formal publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited. Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

Proofreading

One set of proofs, as an e-mail PDF, will be sent to the corresponding author as given on the title page of the manuscript. Only typesetter's errors may be corrected; no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and

accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections are not possible, so please ensure your first sending is complete.

Offprints

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

Author enquiries

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

Online manuscript tracking

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