

URI - CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LIPASES DE *Penicillium*
verrucosum E *Penicillium brevicompactum* UTILIZANDO COMO SUBSTRATOS
TORTA DE BABAÇU E FARELO DE MAMONA**

MARCELI FERNANDES SILVA

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

ERECHIM, RS – BRASIL

MARÇO 2010

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LIPASES DE
Penicillium verrucosum E *Penicillium brevicompactum* UTILIZANDO
COMO SUBSTRATOS TORTA DE BABAÇU E FARELO DE MAMONA**

Marceli Fernandes Silva

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Débora de Oliveira, D. Sc.
(Orientadora)

Helen Treichel, D. Sc.
(Orientadora)

Marco Di Luccio D. Sc.
URI – Campus de Erechim

Rodrigo Volcan Almeida D. Sc.
IQ/UFRJ

Erechim, Março de 2010.

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DO URI – CAMPUS DE ERECHIM.

**“Não fiz o melhor, mas fiz tudo para
que o melhor fosse feito. Não sou o que
deveria ser, mas não sou o que era antes.”**

Martin Luther King

Dedico esta conquista a todos que acreditaram em mim, me deram apoio nas horas que mais precisei e souberam me entender nos dias em que estava tudo meio complicado.

Agradecimentos

Considero-me uma pessoa privilegiada por chegar até aqui, pelos caminhos que escolhi e pelas oportunidades que me foram concedidas, e para isso devo meu agradecimento aqueles que contribuíram para a realização desta conquista.

Agradeço a minha família por me apoiar, amar e incentivar nas horas em que tinha vontade de chutar tudo para o alto. Obrigadooooooooooooo Mãe, tia Ni, Lu e ao meu namorado, marido, companheiro e, sobretudo amigo, Junior, que estava sempre perto quando tudo não ia muito bem.

Obrigado a minha sempre “ORI” Helen, se hoje eu estou seguindo o caminho da pesquisa foi por sua influência, conselhos, apoio e palavras de carinho quando tudo parecia perdido; a minha nova “ORI” Debby e ao meu “ORI” de coração Marco, popularmente chamado de Di Luccio, agradeço a vocês pela confiança depositada em mim, e por acreditar no meu trabalho.

Ao pessoal dos Laboratórios – Peque, Morga, Jami, Jona, Aline, Robi, Renata, Dani, Lenir, Vivi, Ale, Graci, Cláudia, Ju, Irede, Ise – desculpe se esqueço alguém, mas quero que todos se lembrem sempre que um trabalho não é feito somente de experimentos, mas também de amigos e palavras de incentivo.

A minha amiga Sil pela ajuda, amizade, companherismo e momento de alegria, principalmente nos dias em que o bicho estava pegando, você tornou meus dias muito mais fáceis. Obrigado pela sua amizade.

Ao pessoal da Central de Materiais (Andi, Marci, Mada, Su, Vera, Rose, Douglas e Tassi), sempre dispostos a ajudar.

A CENPES/Petrobras pelo apoio financeiro e incentivo a pesquisa.

A todas as pessoas que de uma maneira ou de outra, perto ou distantes, contribuíram para a realização deste trabalho. Seja pelo apoio em todos os momentos, ou pelos obstáculos impostos, que contribuíram ainda mais para o meu crescimento.

Se hoje eu estou aqui devo muito a vocês. Meu muito obrigado!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XVI
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 ENZIMAS	3
2.2 ENZIMAS LIPOLÍTICAS	4
2.2.1 <i>Lipases</i>	5
2.2.2 <i>Produção de lipases</i>	8
2.2.3 <i>Micro-organismo</i>	10
2.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)	12
2.3.1 <i>Suplementação do meio fermentativo</i>	15
2.3.2 <i>Variáveis que afetam o processo fermentativo</i>	20
2.4 PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO	23
2.5 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	26
2.5.1 <i>Imobilização em Accurel</i>	27
2.5.2 <i>Imobilização em Alginato de sódio e Carvão ativado</i>	28
2.6 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS	29
2.6.1 <i>Estabilidade</i>	30
2.6.2 <i>Especificidade</i>	31
2.7 LIPASE NA SÍNTESE DE BIODIESEL	32
2.8 CARACTERIZAÇÃO DOS CATALISADORES	35
2.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 MATERIAIS	38
3.2 EQUIPAMENTOS	39
3.3 MÉTODOS	40
3.3.1 <i>Micro-organismos</i>	41
3.3.2 <i>Manutenção das Cepas</i>	41
3.3.3 <i>Fermentação em Estado Sólido (FES)</i>	41
3.3.3.1 <i>Inóculo</i>	41
3.3.3.2 <i>Obtenção de Substrato-Suporte</i>	42
3.3.3.3 <i>Composição físico-química do farelo de mamona e torta de babaçu</i>	42
3.3.3.3.1 <i>Determinação do teor de ácidos graxos totais</i>	43
3.3.3.3.2 <i>Determinação de gorduras pelo método de Bligh-Dyer (1959)</i>	43

3.3.3.3.3	Determinação de Nitrogênio Kjeldahl Total (NKT).....	44
3.3.3.3.4	Umidade	45
3.3.3.3.5	Minerais.....	45
3.3.3.4	Fermentação em Estado Sólido (FES)	45
3.3.3.5	Estudo da suplementação do farelo de mamona e torta de babaçu	46
3.3.3.6	Estudo da produção de lipase.....	47
3.3.4	<i>Processo de extração da enzima</i>	49
3.3.5	<i>Determinação de atividade enzimática</i>	50
3.3.5.1	Determinação da atividade hidrolítica	50
3.3.5.2	Determinação da atividade de esterificação	51
3.3.5.3	Determinação de atividade proteásica.....	51
3.3.6	<i>Concentração da lipase</i>	52
3.3.7	<i>Determinação de proteína pelo método de Bradford (1976)</i>	53
3.3.8	<i>Imobilização das lipases</i>	53
3.3.8.1	Imobilização em Accurel	53
3.3.8.2	Imobilização em Alginato de Sódio e Carvão Ativado	55
3.3.9	<i>Caracterização parcial do extrato enzimático</i>	56
3.3.9.1	Especificidade do extrato enzimático com atividade de esterificação	56
3.3.9.2	Especificidade do extrato enzimático com atividade hidrolítica	56
3.3.9.3	Estabilidade a baixas temperaturas	57
3.3.10	<i>Alcoólise de óleo vegetal utilizando lipases como catalisadores</i>	57
3.3.10.1	Substrato e solvente	57
3.3.10.2	Procedimento experimental para reação.....	57
3.3.10.3	Determinação da conversão da reação	58
3.3.11	<i>Caracterização dos catalisadores</i>	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO.....	59
4.2	MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR <i>PENICILLIUM VERRUCOSUM</i> EM TORTA DE BABAÇU E FARELO DE MAMONA	60
4.3	OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR <i>PENICILLIUM BREVICOMPACTUM</i> EM TORTA DE BABAÇU E FARELO DE MAMONA	63
4.3.1	<i>Maximização da produção da lipase hidrolítica</i>	63
4.3.2	<i>Maximização da atividade de esterificação</i>	78
4.3.3	<i>Concentração do extrato enzimático por precipitação com sulfato de amônio</i>	85
4.3.4	<i>Imobilização de lipases</i>	92
4.3.5	<i>Caracterização Parcial do Extrato Enzimático</i>	95
4.3.5.1	Estabilidade do Extrato Enzimático à baixas temperaturas	95
4.3.5.2	Especificidade do extrato enzimático	100
	Especificidade do extrato enzimático frente a diferentes alcoóis e ácidos graxos	100
	Especificidade do extrato enzimático a diferentes triglicerídeos	105

4.3.6	<i>Teste preliminar de aplicação do extrato enzimático na alcoólise de óleo vegetal.....</i>	<i>107</i>
4.3.7	<i>Caracterização do catalisador</i>	<i>109</i>
5	CONCLUSÕES.....	111
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	115
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
	ANEXOS	146

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – PRINCIPAIS APLICAÇÕES DE LIPASES EM DIFERENTES SEGMENTOS	8
TABELA 2 – MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES	11
TABELA 3 – RESÍDUOS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE LIPASE EM FES	14
TABELA 4 – SUPLEMENTOS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE LIPASE EM FES E FS.....	17
TABELA 5 – SUBSTRATOS NATURAIS E MICRO-ORGANISMOS ENVOLVIDOS NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DE LIPASES.....	20
TABELA 6 – CONCENTRAÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO UTILIZADA PARA AUMENTAR O RENDIMENTO DAS LIPASES.....	25
TABELA 7 – VARIÁVEIS E NÍVEIS ESTUDADOS NOS PLANEJAMENTOS 1, 2, 3 E 4.....	48
TABELA 8 – VARIÁVEIS E NÍVEIS ESTUDADOS NOS PLANEJAMENTOS 5 E 6.....	49
TABELA 9 – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS SUBSTRATOS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FES.	60
TABELA 10 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (2) (VALORES REAIS E CODIFICADOS) COM AS RESPOSTAS DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA PARA FES COM <i>P. VERRUCOSUM</i> UTILIZANDO COMO MEIO TORTA DE BABAÇU.	61
TABELA 11 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (4) (VALORES REAIS E CODIFICADOS) COM AS RESPOSTAS DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA PARA FES COM <i>P. VERRUCOSUM</i> UTILIZANDO COMO MEIO FARELO DE MAMONA.....	62
TABELA 12 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (1) (VALORES REAIS E CODIFICADOS) COM AS RESPOSTAS DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA PARA FES COM <i>P.</i> <i>BREVICOMPACTUM</i> UTILIZANDO COMO MEIO TORTA DE BABAÇU.	64
TABELA 13 – MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (3) (VALORES REAIS E CODIFICADOS) COM AS RESPOSTAS DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA PARA FES COM <i>P.</i> <i>BREVICOMPACTUM</i> UTILIZANDO COMO MEIO FARELO DE MAMONA.....	65
TABELA 14 – MATRIZ DO PLANEJAMENTO (5) EXPERIMENTAL COMPLETO (VALORES REAIS E CODIFICADOS) COM AS RESPOSTAS DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA COM <i>P.</i> <i>BREVICOMPACTUM</i> E TORTA DE BABAÇU EM 72 H E 96 H.	68
TABELA 15 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO (6) EXPERIMENTAL COMPLETO (VALORES REAIS E CODIFICADOS) COM AS RESPOSTAS DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA COM <i>P.</i> <i>BREVICOMPACTUM</i> E FARELO DE MAMONA EM 72H E 96H.	69
TABELA 16 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE HIDROLÍTICA NO TEMPO 72 HORAS, UTILIZANDO <i>P. BREVICOMPACTUM</i> E TORTA DE BABAÇU.....	70

TABELA 17- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE HIDROLÍTICA NO TEMPO 96 HORAS, UTILIZANDO <i>P. BREVICOMPACTUM</i> E TORTA DE BABAÇU.....	71
TABELA 18 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE HIDROLÍTICA NO TEMPO 72 HORAS, UTILIZANDO <i>P. BREVICOMPACTUM</i> E FARELO DE MAMONA.	73
TABELA 19 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE HIDROLÍTICA NO TEMPO 96 HORAS, UTILIZANDO <i>P. BREVICOMPACTUM</i> E FARELO DE MAMONA.	73
TABELA 20 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPLETO (VALORES REAIS E CODIFICADOS) COM AS RESPOSTAS DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO COM <i>P. BREVICOMPACTUM</i> E TORTA DE BABAÇU EM 72H E 96H.....	78
TABELA 21 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO NO TEMPO 72 HORAS, UTILIZANDO <i>P. BREVICOMPACTUM</i> E TORTA DE BABAÇU.....	80
TABELA 22 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO NO TEMPO 96 HORAS, UTILIZANDO <i>P. BREVICOMPACTUM</i> E TORTA DE BABAÇU.....	80
TABELA 23 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPLETO (VALORES REAIS E CODIFICADOS) COM AS RESPOSTAS DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO COM <i>P. BREVICOMPACTUM</i> E FARELO DE MAMONA EM 72H E 96H.	82
TABELA 24 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO NO TEMPO 72 HORAS, UTILIZANDO <i>P. BREVICOMPACTUM</i> E FARELO DE MAMONA.	83
TABELA 25 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO NO TEMPO 96 HORAS, UTILIZANDO <i>P. BREVICOMPACTUM</i> E FARELO DE MAMONA.....	83
TABELA 26 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPLETO (VALORES REAIS E CODIFICADOS) COM AS RESPOSTAS DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO E ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO EXTRATO PRECIPITADO OBTIDO DA FES COM <i>P. BREVICOMPACTUM</i> E FARELO DE BABAÇU EM 72H E 96 H.	86
TABELA 27 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPLETO (VALORES REAIS E CODIFICADOS) COM AS RESPOSTAS DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO E ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO EXTRATO PRECIPITADO OBTIDO DA FES COM <i>P. BREVICOMPACTUM</i> E FARELO DE MAMONA EM 72H E 96 H.....	89
TABELA 28 - ATIVIDADE ESPECÍFICA DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS OBTIDOS POR FES DE <i>P. BREVICOMPACTUM</i> COM TORTA DE BABAÇU E FARELO DE MAMONA, RESPECTIVAMENTE.	91
TABELA 29 – RESULTADOS OBTIDOS PARA IMOBILIZAÇÃO COM ACCUREL E SOLUÇÃO DE ALGINATO DE SÓDIO E CARVÃO ATIVADO.	93
TABELA 30 – CONVERSÕES OBTIDAS NA ALCOÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE SOJA EM SOLVENTE ORGÂNICO.	108
TABELA 31 – RESULTADO DA CARACTERIZAÇÃO DOS CATALISADORES PELA ANÁLISE DE BET	109

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – MODELO DA CATÁLISE ENZIMÁTICA DO MECANISMO CHAVE E FECHADURA PROPOSTO POR EMIL FISCHER E MODIFICADO POR KOSHLAND JR.	4
FIGURA 2 – BÉQUERES DE POLIPROPILENO UTILIZADOS PARA O PROCESSO FERMENTATIVO	46
FIGURA 3 - EFEITOS DAS VARIÁVEIS MANIPULADAS SOBRE A ATIVIDADE HIDROLÍTICA <i>P. BREVICOMPACTUM</i> EM TORTA DE BABAÇU, (A) ANÁLISE EM 72 HORAS E (B) ANÁLISE EM 96 HORAS.....	65
FIGURA 4 - EFEITOS DAS VARIÁVEIS MANIPULADAS SOBRE A ATIVIDADE HIDROLÍTICA <i>P. BREVICOMPACTUM</i> EM FARELO DE MAMONA, (A) ANÁLISE 72 HORAS E (B) ANÁLISE EM 96 HORAS.....	67
FIGURA 5 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTAS PARA ATIVIDADE HIDROLÍTICA (A) 72 HORAS DE FERMENTAÇÃO E (B) 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO AMBAS UTILIZANDO <i>P. BREVICOMPACTUM</i> E TORTA DE BABAÇU.....	72
FIGURA 6 – CURVAS DE CONTORNO PARA ATIVIDADE HIDROLÍTICA (A) 72 HORAS DE FERMENTAÇÃO E (B) 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO AMBAS UTILIZANDO <i>P. BREVICOMPACTUM</i> E TORTA DE BABAÇU.....	72
FIGURA 7 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTAS PARA ATIVIDADE HIDROLÍTICA (A) 72 HORAS DE FERMENTAÇÃO E (B) 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO AMBAS UTILIZANDO <i>P. BREVICOMPACTUM</i> E FARELO DE MAMONA.	75
FIGURA 8 - CURVAS DE CONTORNO PARA ATIVIDADE HIDROLÍTICA (A) 72 HORAS DE FERMENTAÇÃO E (B) 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO AMBAS UTILIZANDO <i>P. BREVICOMPACTUM</i> E FARELO DE MAMONA.	75
FIGURA 9 – APARÊNCIA DOS SUBSTRATOS APÓS PERÍODO DE FERMENTAÇÃO: (A) TORTA DE BABAÇU TEMPO 0 H, 72 H E 96 H, (B) FARELO DE MAMONA TEMPO 0 H, 72 H E 96 H.	77
FIGURA 10 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTAS PARA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO (A) 72 HORAS DE FERMENTAÇÃO E (B) 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO AMBAS UTILIZANDO <i>P. BREVICOMPACTUM</i> E TORTA DE BABAÇU.....	81
FIGURA 11 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTAS PARA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO (A) 72 HORAS DE FERMENTAÇÃO E (B) 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO AMBAS UTILIZANDO <i>P. BREVICOMPACTUM</i> E FARELO DE MAMONA.	84
FIGURA 12 - EFEITOS DAS VARIÁVEIS MANIPULADAS SOBRE A ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO EXTRATO PRECIPITADO OBTIDO DA FES DE <i>P. BREVICOMPACTUM</i> EM TORTA DE BABAÇU, (A) ANÁLISE EM 72 HORAS E (B) ANÁLISE EM 96 HORAS.	87

FIGURA 13 - EFEITOS DAS VARIÁVEIS MANIPULADAS SOBRE A ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DO EXTRATO PRECIPITADO OBTIDO DA FES DE <i>P. BREVICOMPACTUM</i> EM TORTA DE BABAÇU, (A) ANÁLISE EM 72 HORAS E (B) ANÁLISE EM 96 HORAS.	87
FIGURA 14 - EFEITOS DAS VARIÁVEIS MANIPULADAS SOBRE A ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO <i>P. BREVICOMPACTUM</i> EM FARELO DE MAMONA, (A) ANÁLISE EM 72 HORAS , (B) ANÁLISE EM 96 HORAS E SOBRE A ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO (C) ANÁLISE EM 72 HORAS E (D) ANÁLISE EM 96 HORAS, AMBAS DO EXTRATO PRECIPITADO.....	90
FIGURA 15 – ENZIMAS IMOBILIZADAS EM (A) SOLUÇÃO DE ALGINATO DE SÓDIO COM CARVÃO ATIVADO E (B) ACCUREL EP100.....	94
FIGURA 16 – ESTABILIDADE PARA O EXTRATO ENZIMÁTICO ARMAZENADO EM CONGELADOR	97
FIGURA 17 - ESTABILIDADE PARA O EXTRATO ENZIMÁTICO ARMAZENADO EM GELADEIRA (4°C), (A) ATIVIDADE HIDROLÍTICA E (B) ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO. AMOSTRA 1 - PLANEJAMENTO 5, ENSAIO 4 72 HORAS E EXTRATO PRECIPITADO; AMOSTRA 2 - PLANEJAMENTO 5, PONTO CENTRAL, 72 HORAS E EXTRATO BRUTO; AMOSTRA 3 – PLANEJAMENTO 6, PONTO CENTRAL, 96 HORAS E EXTRATO BRUTO E AMOSTRA 4 – PLANEJAMENTO 6, PONTO CENTRAL, 96 HORAS E EXTRATO PRECIPITADO.	99
FIGURA 18 - ESPECIFICIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO DA REAÇÃO DO ÁCIDO OLÉICO EM DIFERENTES ALCOÓIS. AMOSTRA 1 - PLANEJAMENTO 5, ENSAIO 4 72 HORAS E EXTRATO PRECIPITADO; AMOSTRA 2 - PLANEJAMENTO 5, PONTO CENTRAL, 72 HORAS E EXTRATO BRUTO; AMOSTRA 3 – PLANEJAMENTO 6, PONTO CENTRAL, 96 HORAS E EXTRATO BRUTO E AMOSTRA 4 – PLANEJAMENTO 6, PONTO CENTRAL, 96 HORAS E EXTRATO PRECIPITADO.	101
FIGURA 19 - ESPECIFICIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO DA REAÇÃO DO ÁCIDO BUTÍRICO EM DIFERENTES ALCOÓIS. AMOSTRA 1 - PLANEJAMENTO 5, ENSAIO 4 72 HORAS E EXTRATO PRECIPITADO; AMOSTRA 2 - PLANEJAMENTO 5, PONTO CENTRAL, 72 HORAS E EXTRATO BRUTO; AMOSTRA 3 – PLANEJAMENTO 6, PONTO CENTRAL, 96 HORAS E EXTRATO BRUTO E AMOSTRA 4 – PLANEJAMENTO 6, PONTO CENTRAL, 96 HORAS E EXTRATO PRECIPITADO.	102
FIGURA 20 - ESPECIFICIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO NA REAÇÃO DO ÁCIDO LÁURICO EM DIFERENTES ALCOÓIS. AMOSTRA 1 - PLANEJAMENTO 5, ENSAIO 4 72 HORAS E EXTRATO PRECIPITADO; AMOSTRA 2 - PLANEJAMENTO 5, PONTO CENTRAL, 72 HORAS E EXTRATO BRUTO; AMOSTRA 3 – PLANEJAMENTO 6, PONTO CENTRAL, 96 HORAS E EXTRATO BRUTO E AMOSTRA 4 – PLANEJAMENTO 6, PONTO CENTRAL, 96 HORAS E EXTRATO PRECIPITADO.	104

FIGURA 21 - ESPECIFICIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO NA REAÇÃO COM DIFERENTES TRIGLICERÍDEOS. AMOSTRA 1 - PLANEJAMENTO 5, ENSAIO 4 72 HORAS E EXTRATO PRECIPITADO; AMOSTRA 2 - PLANEJAMENTO 5, PONTO CENTRAL, 72 HORAS E EXTRATO BRUTO; AMOSTRA 3 - PLANEJAMENTO 6, PONTO CENTRAL, 96 HORAS E EXTRATO BRUTO E AMOSTRA 4 - PLANEJAMENTO 6, PONTO CENTRAL, 96 HORAS E EXTRATO PRECIPITADO. 105

Resumo

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LIPASES DE *Penicillium verrucosum* E *Penicillium brevicompactum* UTILIZANDO COMO SUBSTRATOS TORTA DE BABAÇU E FARELO DE MAMONA

Marceli Fernandes Silva

Março/2010

Orientadores: Helen Treichel

Débora de Oliveira

As enzimas lipolíticas constituem, atualmente, o mais importante grupo de enzima com enorme potencial para aplicações biotecnológicas. As lipases (EC 3.1.1.3) e as esterases (EC 3.1.1.1) fazem parte de um importante grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e a hidrólise dos lipídeos, amplamente distribuídos na natureza. As lipases atuam preferencialmente em triglicerídeos (TAGs) de cadeia média e longa, enquanto as esterases em substratos de cadeia curta. O objetivo deste trabalho foi investigar a produção de lipase por *Penicillium brevicompactum* e *Penicillium verrucosum* por fermentação em estado sólido. Os efeitos das variáveis de processo para maximização da produção das enzimas foram investigados utilizando-se a técnica de planejamento experimental. A condição otimizada para a produção de lipase e esterase foi em meio contendo óleo de soja 2% m/m, umidade 70%, temperatura 30°C, tanto para o farelo de mamona como para a torta de babaçu. Na produção de enzimas com as cepas de *Penicillium verrucosum*, os resultados obtidos não se mostraram promissores. Atividades máximas de hidrólise (48,6U/g e 87,7U/g) foram alcançadas utilizando-se o fungo *P. brevicompactum* em torta de babaçu e farelo de mamona, respectivamente. Esta condição também produziu as maiores atividades de esterificação (244U/g), mas somente utilizando a torta de babaçu como substrato. A maior atividade de esterificação do extrato pré-purificado com sulfato de amônio (60%) foi de 207U/g. O extrato enzimático obtido nesta condição foi imobilizado em alginato de sódio e carvão

ativado. O extrato enzimático imobilizado foi utilizado como catalisador em reação de alcoólise usando como substrato óleo de soja e etanol, em solvente orgânico, atingindo conversões de 15%, mostrando que a enzima produzida neste trabalho pode ser um catalisador potencial para aplicação na síntese de ésteres e transesterificação de óleos.

Abstract

PRODUCTION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF LIPASES BY *Penicillium verrucosum* AND *Penicillium brevicompactum* USING BABASSU CAKE AND CASTOR OIL MEAL AS SUBSTRATES

Marceli Fernandes Silva

March/2010

Advisors: Helen Treichel

Débora de Oliveira

Hydrolases are considered currently one of the most important group of enzymes, with high potential biotechnological applications. Lipases (EC 3.1.1.3) and esterases (EC 3.1.1.1) are part of an important group of enzymes associated with the metabolism and the hydrolysis of lipids, and are widely distributed in nature. The lipases act preferentially on triglycerides of medium and long chain, while the esterases in short chain substrates. The objective of this work was to investigate the lipase production by *Penicillium brevicompactum* and *Penicillium verrucosum* by solid state fermentation. The effects of process variables for maximization of enzyme production were investigated by experimental design technique. The optimized condition for hydrolytic and esterification activities using *Penicillium brevicompactum* was achieved using soybean oil supplementation of 2wt%, moisture content 70%, temperature 30°C, for both substrates. The enzyme activities obtained for *Penicillium verrucosum* were considered unsatisfactory. Higher hydrolytic activities of 48.6U/g and 87.7U/g were obtained by *P. brevicompactum* using babassu cake and castor oil meal, respectively. This condition also conducted to the highest values for esterification activities (244U/g) using babassu cake as substrate. The concentration of the enzymatic extract with ammonium sulphate 60% led to esterification activities of 207U/g. The pre-purified

enzymatic extract obtained in this step was immobilized both in sodium alginate and activated coal. The immobilized extract was previously tested as catalyst in alcoholysis of soybean oil and ethanol, in organic solvent, reaching a biodiesel conversion of about 15%, showing that the enzyme produced in this work can be a potential catalyst for application in esters synthesis and transesterification of vegetal oils.

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia enzimática é hoje um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado.

Há um amplo campo de aplicações industriais para lipases, que vem se expandindo nas últimas décadas. Por outro lado, percebe-se uma tendência atual de estudar os processos biotecnológicos de uma forma mais ampla, tentando interrelacionar estratégias e procedimentos adequados, desde as etapas de otimização da produção até aplicação final da enzima, com intuito de reduzir custos e melhorar a qualidade final do produto (Maldonado, 2006).

Lipases são biocatalisadores de importância em diferentes áreas, podendo catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito. Este fenômeno é primariamente devido à sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos bem como sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos. As lipases microbianas são mais utilizadas por sua relativa facilidade de produção e abundância de micro-organismos capazes de sintetizá-las (Krieger *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 1999; Saxena *et al.*, 1999).

A aplicação de tortas residuais do processo de extração de óleos vegetais, de soja, côco, gergelim e oliva, como fonte de nutrientes para vários processos biotecnológicos pode contribuir para se encontrar combinações ideais para se obter lipases com altos rendimentos (Ramachandran *et al.*, 2007).

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas e aprimoradas para a obtenção de maiores rendimentos de produção, além de lipases mais robustas e altamente específicas, ampliando as possibilidades de aplicações industriais (Soccol e Vandenberghe, 2003). Desta forma, torna-se interessante a exploração da biodiversidade buscando micro-organismos hábeis a produzir lipases, considerando que estas são enzimas que podem ser secretadas por uma grande quantidade de micro-organismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras (Saxena *et al.*, 2003), indicando assim, perspectiva promissora na área científica e comercial.

A fermentação em estado sólido (FES) tem se mostrado como uma alternativa na produção de enzimas microbianas, devido à possibilidade de utilização de resíduos e

subprodutos da agroindústria como fonte de nutrientes e suporte para o desenvolvimento do micro-organismo (Castilho *et al.*, 2000; Soccol e Vandenberghe, 2003; Pandey, 2003).

A utilização de subprodutos agroindustriais como substrato na produção de lipases, além de agregar valor a materiais de baixo custo no mercado, pode vir a reduzir em muito o preço final da enzima, sendo que a aplicação da fermentação em estado sólido em muitos casos diminui consideravelmente os custos do processo, quando comparada à fermentação submersa (Castilho *et al.*, 2000).

O aumento no número de aplicações de lipases em sínteses e biotransformações impulsionaram o estudo de imobilização desta enzima. A imobilização, além de possibilitar o reuso do biocatalisador, pode melhorar a estabilidade e a atividade da enzima, principalmente na presença de solventes orgânicos (Sharma *et al.*, 2001).

Dentro desta perspectiva é que este trabalho foi realizado, visando o estudo da otimização do meio para produção e caracterização parcial da lipase bruta e pré-concentrada de *P. brevicompactum* e *P. verrucosum* em dois diferentes substratos. Além de buscar uma interrelação entre todas estas etapas, outros diferenciais deste trabalho foram: utilização de resíduos agroindustriais como substrato, a escolha do melhor suplemento, o estudo prévio das condições de imobilização e aplicação da enzima obtida na reação de alcoólise.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão sobre lipases incluindo definição, aplicações, fontes e propriedades, considerações gerais sobre fermentação em estado sólido, bem como imobilização e purificação de enzimas e utilização destas, como catalisadores para reações específicas.

2.1 ENZIMAS

As enzimas são biocatalisadores com propriedades que as tornam altamente requisitadas. Além de serem ativas e versáteis, elas catalisam uma série de transformações de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reação, o que as difere dos catalisadores convencionais. Outra vantagem na utilização de enzimas é a facilidade em se regular a atividade enzimática, pois para isso basta modificar a natureza do meio de reação, alterar pH ou adicionar suplementos. Além disso, toda enzima catalisa as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas, comuns em sínteses químicas, devido à sua especificidade (Dziezak, 1991; Patel, 2002; Pizarro e Park, 2003).

O estudo das ações de enzimas em reações do metabolismo levou à identificação e purificação de milhares delas, à elucidação de sua estrutura molecular e do seu mecanismo químico de ação e a uma compreensão geral de como elas funcionam (Lehninger, 1970 *apud* Brígida, 2006). Tal descoberta promoveu a identificação de potenciais aplicações tecnológicas, dentre as quais se destacaram as realizadas na indústria de alimentos e bebidas, sendo estas praticadas há mais de cinquenta anos, beneficiando tanto o processamento quanto a qualidade dos produtos (Faber, 1997; Lehninger, 1970 *apud* Brígida, 2006).

A formação de um complexo, enzima-substrato (ES), é a primeira etapa na catálise enzimática. Os substratos são ligados a uma região específica chamada de centro ativo, ou sítio ativo, contendo os resíduos de aminoácidos que participam diretamente na formação e quebra de ligações. Esses radicais são chamados grupamentos catalíticos (João, 1999).

Entre as teorias e racionalizações que têm sido desenvolvidas para entender a catálise enzimática, o modelo mais ilustrativo é o mecanismo de chave e fechadura desenvolvido por Emil Fischer em 1894, e o mecanismo do encaixe induzido de Koshland Jr que sugeriu uma modificação ao modelo de chave-fechadura: uma vez que as enzimas exibem estruturas flexíveis, os sítios ativos alteram a sua forma de maneira continuada através de interações com o substrato, enquanto esse mesmo substrato vai interagindo com a enzima. A Figura 1 mostra o modelo da catálise enzimática do mecanismo da chave e fechadura proposto por Emil Fischer e modificado por Koshland Jr (De Carli, 2006; Koshland Jr, 1958).

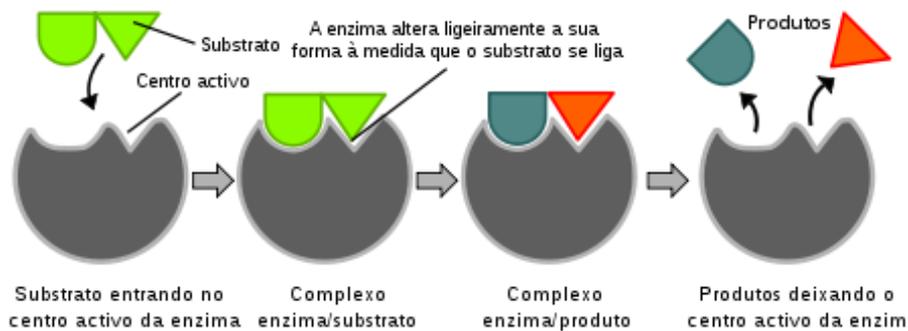


Figura 1 – Modelo da catálise enzimática do mecanismo chave e fechadura proposto por Emil Fischer e modificado por Koshland Jr.

Em geral, as enzimas aceleram as reações por um fator de ordem de 10^6 a 10^{14} . Um estudo estimou que a enzima ácido orótico descarboxilase aumenta a velocidade reacional em 10^{17} vezes comparada à reação não catalítica (Ferreira, 2002).

2.2 ENZIMAS LIPOLÍTICAS

As lipases e as esterases constituem um importante grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e a hidrólise dos lipídios. São amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em organismos animais e vegetais e, também, em células de micro-organismos (Reed, 1975 *apud* Gonçalves, 2007; Oliveira, 2000). As enzimas

lipolíticas, juntamente com as celulases constituem, atualmente, importantes grupos de enzimas com enorme potencial para aplicações biotecnológicas (Jaeger e Eggert, 2002).

Ainda, existe certa confusão em torno da definição exata dos termos lipases e esterases. As lipases (EC 3.1.1.3), denominadas verdadeiras, são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial do triacilglicerol a diacliglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres, apresentando capacidade única de agir na interface óleo/água. As esterases (EC 3.1.1.1) são as enzimas que agem em ésteres solúveis em água ou que hidrolisam outros lipídios (Carvalho *et al.*, 2003).

2.2.1 Lipases

Embora a lipase mais estudada até hoje seja a lipase pancreática, do ponto de vista industrial, as lipases microbianas são interessantes por permitirem produção em maior escala. Além disso, podem mais facilmente ser expressas, via clonagem, em outros organismos, o que facilita sua obtenção e purificação (Palekar *et al.*, 2000).

As lipases provenientes de micro-organismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, devido principalmente à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato e facilidade de produção em escala, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial (Hasan *et al.*, 2006).

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica principalmente por não requererem cofatores, atuarem em uma faixa de pH relativamente amplo, serem muito estáveis neste meio, apresentarem especificidade, regiosseletividade e enancioseletividade. As lipases têm sido extensivamente investigadas com relação às suas propriedades bioquímicas e fisiológicas e, mais recentemente, para aplicações industriais (Pandey *et al.*, 1999; Gandhi, 1997; Bilanicová *et al.*, 2008).

Contudo, sob condições microaquosas, elas são capazes de catalisar a síntese de éster a partir de álcool e ácido carboxílico. Uma combinação destes dois processos básicos em sequências lógicas pode resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise ou transesterificação a depender dos reagentes de partida) (Castro *et al.*, 2004).

O processo de transesterificação, também chamado de alcoólise, consiste no deslocamento do álcool e de um éster em um processo similar à hidrólise, exceto pelo

emprego de um álcool ao invés da água. Alguns álcoois são empregados de modo satisfatório na reação, dentre estes pode-se citar, o metanol, etanol, propanol e o butanol, sendo que o mais amplamente utilizado é o metanol devido ao baixo custo e às vantagens físicas e químicas deste reagente (Fukuda *et al.*, 2001).

As propriedades catalíticas das lipases como a seletividade e a estereoespecificidade, dentre outras, podem ser de fácil controle através da manipulação nas condições das reações. A dependência destas propriedades catalíticas com o meio reacional pode ser uma consequência do complexo mecanismo de ação das lipases, que envolvem mudanças conformacionais em sua estrutura (Sabuquillo *et al.*, 1998).

As lipases microbianas apresentam uma série de vantagens se comparadas as de origem animal e vegetal, uma vez que são enzimas extracelulares em sua grande maioria, são facilmente separadas do micélio por filtração ou centrifugação (Essamri *et al.*, 1998; Jesus *et al.*, 1999), possuem alta velocidade de síntese e alto rendimento de conversão de substrato em produto (Leal, 2000).

Além disso, as lipases são enzimas estáveis (Corzo *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2001) e apresentam versatilidade e simplicidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva (Sharma *et al.*, 2001).

Diante da versatilidade das lipases frente às reações por elas catalisadas, a aplicação industrial destas enzimas estende-se tanto ao setor alimentício – produção de laticínios, óleos, bebidas, etc. – quanto ao setor químico – produção de detergentes, fármacos e pesticidas, aplicação como biossensores, na proteção ambiental, etc (Pandey *et al.*, 1999; Paiva *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2001).

As lipases são utilizadas em diversos campos de aplicação, devido às suas características biocatalíticas. A Tabela 1 sintetiza as principais aplicações das lipases em diferentes segmentos (Martins *et al.*, 2008; Hasan *et al.*, 2006; Jaeger e Eggert, 2002; Villeneuve *et al.*, 2000), considerando as reações de hidrólise e a esterificação.

Uma das limitações atuais para a utilização industrial extensiva das lipases de origem microbiana tem sido o custo de obtenção, que é determinado pelo rendimento da produção, pelas condições do processo e pela estabilidade da enzima (Xu *et al.*, 2008). Portanto, é interessante que se procure aumentar a produtividade dos processos fermentativos pelo emprego de novos micro-organismos melhores produtores e pela otimização das condições de cultivo. Como a matéria prima do meio de cultura

contribui significativamente para o custo total da produção, a redução das quantidades de matéria prima e o emprego de matérias mais baratas ou resíduos agroindustriais, poderia ser, também, uma estratégia adequada para aumentar a produtividade do processo (Dominguez *et al.*, 2003).

Cabe ressaltar que as aplicações das lipases estão em número bastante reduzido em relação às possibilidades de utilização desta enzima no futuro. Sua utilização está diretamente relacionada à redução dos custos dos processos de produção e purificação, na busca por novas cepas produtoras e no melhoramento genético destas cepas, a fim de que produzam maiores quantidades destas enzimas em tempos menores, com características desejáveis (Martins *et al.*, 2001).

Até agora, a produção de lipases microbianas para utilização em reações de esterificação e transesterificação tem sido feita majoritariamente por fermentação submersa, que é um processo relativamente caro, pois também envolve recuperação da enzima do meio de fermentação, e quase sempre, a imobilização posterior da enzima. Neste contexto, a produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES) apresenta-se como uma possibilidade interessante, particularmente se o próprio sólido fermentado contendo a enzima puder ser utilizado diretamente para catálise da reação (Fernandes *et al.*, 2007).

Tabela 1 – Principais aplicações de lipases em diferentes segmentos

Indústria	Aplicações	Produtos
Hidrólise		
Alimentos	Hidrólise da gordura do leite	Desenvolvimento de “Flavour” lácteos
Química	Hidrólise de óleos e gorduras	Ácidos graxos, mono diglicerídeos;
	Biorremediação	Biossurfactantes
Química (detergentes)	Tratamento efluente gorduroso	Redução sólidos
	Análise de ácidos graxos de TGC	
Médica	Remoção de manchas de gorduras	Detergentes (roupas e superfícies)
	Análise de triglicérides do sangue	Kits de diagnóstico
Farmacêutica, agroquímica	Hidrólise estereo-específica	Resolução misturas racêmicas
Esterificação		
Química (química fina)	Síntese de ésteres	Compostos quirais intermediários; terapêutico; Ésteres e emulsificantes; “Flavour”, Fragrância para cosméticos;
Alimentos, Química, Farmacêutica	Transesterificação (óleos naturais)	Óleos e gorduras: análogos de manteiga de cacau, Biodiesel
Têxtil	Síntese de poliésteres	Poliésteres biodegradáveis, aromáticos,
Alimentos	Síntese de ésteres	Aromas para alimentos e bebidas

Fonte: Rigo, 2009.

2.2.2 Produção de lipases

As lipases podem ser encontradas em células de tecidos animais e vegetais, e podem ainda ser produzidas por micro-organismos como bactérias, fungos e leveduras (Sharma *et al.*, 2001; Pastore *et al.*, 2003), sendo que as lipases fúngicas são preferidas por produzirem geralmente enzimas extracelulares, o que facilita a recuperação da enzima do caldo de fermentação (Dai *et al.*, 2005).

Na busca da elevação dos níveis de produção da enzima, várias técnicas de clonagem de micro-organismos podem ser empregadas buscando uma lipase específica a aplicações de interesse comercial (Burkert *et al.*, 2004).

As lipases propiciam a quebra de emulsões de ésteres, glicerinas e ácidos graxos de cadeia longa, como a trioleína e a tripalmitina (Sharma *et al.*, 2001).

Ambas lipases e esterases são capazes de catalisar a hidrólise de ésteres, embora apenas as lipases atuem sobre ésteres insolúveis em água como os triglicerídeos (Freire *et al.*, 1997a).

A atividade hidrolítica de lipases é significativamente aumentada pela presença de uma interface óleo-água, um fenômeno chamado ativação interfacial. Em meio não-aquoso esta reação é invertida devido a um domínio hidrofóbico que cobre o local ativo da lipase (Sun *et al.*, 2008).

As lipases apresentam um modo de ação semelhante ao das esterases, porém sua atividade aumenta em muito quando situadas na interface polar/apolar. Talvez isto ocorra devido ao fato de uma parte da superfície da enzima se encontrar em melhor equilíbrio termodinâmico quando inserida na interface polar/apolar, colocando o sítio ativo da enzima em posição favorável para a catálise (Pastore *et al.*, 2003).

Como as lipases atuam na interface óleo/água, não obedecem, portanto, às equações de Michaelis-Menten para a cinética enzimática, uma vez que essas são válidas para reações catalíticas que ocorrem numa fase homogênea. Assim, as reações catalisadas por lipases são analisadas em geral, utilizando-se o substrato lipídico sob a forma de emulsão. Por outro lado, à medida que a reação se desenvolve (formação de produto e degradação do substrato), a composição da interface da emulsão varia (Jaeger e Reetz, 1998; Oliveira, 2000).

Entre os fungos, o gênero *Penicillium* se destaca por abranger muitos produtores: *P. expansum* (Stocklein *et al.*, 1993), *P. citrinum* (Miranda *et al.*, 1999), *P. wortmanii* (Costa e Peralta, 1999), *P. chrysogenum* (Manuel *et al.*, 2000), *P. aurantiogriseum* (Lima *et al.*, 2004) e *P. expansum* (Dai *et al.*, 2005).

Muitos autores reportam os procedimentos de isolamento, purificação de lipases e a influência da composição do meio de cultura na produção da enzima. Em particular, a incorporação de diferentes substâncias lipídicas pode resultar na produção de diferentes isoenzimas (Zarevúcka *et al.*, 2005; Saxena *et al.*, 2003).

Lipases provenientes de distintas fontes microbianas normalmente apresentam uma ampla faixa de propriedades dependentes da fonte produtora, relacionada ainda com a especificidade posicional, especificidade ao substrato, termoestabilidade, pH

ótimo entre outros. A temperatura de estabilidade é uma das mais relevantes características para aplicação industrial dos biocatalisadores (Treichel *et al.*, 2009), assim os micro-organismos adaptados, por exemplo, a baixas temperaturas, apresentam potencial produtivo de lipases psicrófilas. Lipases psicrófilas normalmente possuem grande flexibilidade de sua estrutura, o que permite sua aplicação em sistemas com baixo conteúdo de água, diferente comportamento pode ser apresentado pelas enzimas mesófilas ou termófilas, devido à rigidez de suas propriedades catalíticas (Joseph *et al.*, 2008).

Enzimas extracelulares podem ser produzidas em meio sólido ou líquido, que se diferenciam pela quantidade de água livre (*aw*). A produção de lipase microbiana pode ser obtida no processo de Fermentação em Substrato Sólido (FES) ou no processo de Substrato Líquido (FS). Em qualquer situação deve-se empregar meio de cultura que tenha um baixo custo (Lin *et al.*, 2006).

Para que a produção de enzimas seja maximizada é de fundamental importância levar em consideração o meio fermentativo, este devendo proporcionar nutrientes necessários ao crescimento da cepa e produção de metabólitos, além de suprir a energia utilizada para biossíntese de manutenção da célula (Smits *et al.*, 1996).

O meio deve ser composto basicamente por fonte de carbono, fonte de nitrogênio (seja ela orgânica ou inorgânica), sais orgânicos, vitaminas e indutores, quando necessários para a produção de lipase, visto que existem lipases induzíveis e constitutivas (Alonso, 2001). Segundo Dalmau *et al.*, (2000) a presença de substratos lipídicos (e seus metabólitos, como ácidos graxos) pode estimular a produção de lipases.

2.2.3 Micro-organismo

Apesar de todos os avanços obtidos atualmente, objetivando maximizar a síntese de lipases através do uso das cepas microbianas já conhecidas, é fundamental buscar ferramentas como melhoramentos genéticos, tecnologia de DNA recombinante, análise genômicas, de forma a tornar estes micro-organismos apropriados para o uso comercial (Bennet, 1998 *apud* Vargas, 2004; Fungaro e Maccheroni Jr., 2002).

No entanto, a seleção de cepas selvagens hiperprodutoras ainda é uma técnica de grande importância, principalmente em países que apresentam uma grande biodiversidade como o Brasil (Freire e Castilho, 2000).

Atualmente, na literatura, existe uma grande variedade de micro-organismos utilizados como produtores de lipases, contudo, do ponto de vista industrial os fungos são os preferidos, por possuírem a capacidade de se adaptar bem ao meio com baixas quantidades de água, o que facilita a utilização de resíduos agroindustriais, diminuindo assim os custos em sua produção.

Vários métodos podem ser usados para seleção de micro-organismos através da determinação da presença de lipase extracelular. Dentre estas, inclui-se a utilização de meio sólido com presença de substratos indutores como óleos vegetais, triglicerídeos padrão (tributirina, trioleína, etc), Tween 80, e corantes que possibilitam a maior visualização da reação de hidrólise (Damaso *et al.*, 2008; Ko *et al.*, 2005; Cardenas *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1995).

Micro-organismos produtores de lipases apresentam uma ampla faixa de temperatura de crescimento. Em geral, fungos e leveduras têm uma temperatura ótima entre 22 e 30°C (Toida *et al.*, 1995). A Tabela 2 apresenta alguns micro-organismos produtores de lipases.

Tabela 2 – Micro-organismos produtores de lipases

Micro-organismo	Autor/ Referência
<i>P. aeruginosa</i>	Tan <i>et al.</i> (2003)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Prazeres <i>et al.</i> (2006)
<i>Bacillus</i> sp. Intracelular	Ertrugrul <i>et al.</i> (2007)
Extracelular	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Fickers <i>et al.</i> (2006)
<i>Aspergillus Níger</i>	Mahadik <i>et al.</i> (2002)
<i>Geotrichum</i> sp.	Ginalska <i>et al.</i> (2004)
<i>Geobacillus thermolevorans</i> *	Soliman <i>et al.</i> (2007)
<i>Rhizopus chinensis</i>	Sun <i>et al.</i> (2008)
<i>Penicillium restrictum</i>	Freire <i>et al.</i> (1997)

*cepa modificada geneticamente

Alguns processos industriais, nos quais enzimas lipolíticas são empregadas, requerem condições severas, por exemplo, temperatura alta. A instabilidade de enzimas

em condições extremas incitou a procura por enzimas novas que pudessem ser mais resistentes (Tirawongsaroj *et al.* 2008).

Geralmente lipases termofílicas ou termotolerantes são isoladas do solo de regiões quentes como: México (*Rhizopus homothallicus*), Egito (*Geobacillus thermoleovorans*) e Sul da Polônia (*Geotrichum* sp.).

O crescimento deste tipo de fungo pode ser realizado tanto em FS como em FES. Porém, muitos autores defendem as vantagens da FES, pois em estudos de produção de tanase, exopectinases e invertase os rendimentos obtidos com FES foram superiores aos obtidos com FS. Isso se deu devido às altas taxas de crescimento de biomassa e baixa atividade de protease no meio.

No caso específico da produção de lipase via FES, muitas pesquisas são realizadas utilizando culturas fúngicas para fermentação, como *Penicillium restrictum* (Azeredo *et al.*, 2007; Palma *et al.*, 2000; Castilho *et al.*, 2000; Gombert *et al.*, 1999), *Penicillium simplicissimum* (Vargas *et al.*, 2008; Gutarra *et al.*, 2007; 2005; Cavalcanti *et al.*, 2005; Di Luccio *et al.*, 2004), *Penicillium verrucosum* (Kempka *et al.*, 2008), *Penicillium* sp. (Wolski *et al.*, 2009a; 2009b), *Aspergillus oryzae* (Rahardjo *et al.*, 2005), *Rhizopus oligosporous* (Ul-Haq *et al.*, 2002), *Rhizopus homothallicus* (Diaz *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2006), *Rhizopus rhizopodiformis* (Cordova *et al.*, 1998), *Aspergillus niger* MTCC 2594 (Mala *et al.*, 2007).

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando de 20 a 75kDa, atividade em pH entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70°C. São geralmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (Castro *et al.*, 2004).

2.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) é definida como a fermentação envolvendo sólidos em ausência ou quase ausência de água livre, sendo que o substrato deve possuir umidade suficiente para proporcionar o desenvolvimento do metabolismo

dos micro-organismos. O desenvolvimento deste sistema envolve aspectos de Engenharia Bioquímica, incluindo a cinética, modelagem matemática, *design* de biorreatores e sistemas de controle avançado (Couto e Sanromán, 2005; Holker e Lenz, 2005; Pandey, 2003).

Dentre as vantagens apresentadas por esta técnica pode-se citar a simplicidade dos meios de fermentação e os equipamentos utilizados para a fermentação são simples e podem promover altos rendimentos de produção, menor demanda de energia, entre outras (Mahadik *et al.*, 2002).

As condições de crescimento da FES aproximam-se do *habitat* natural de fungos filamentosos, o que facilita o crescimento deste no substrato sólido e a produção de grandes quantidades de enzimas. Os resíduos gerados nos processos agroindustriais podem ser usados como substrato para o crescimento celular. A matéria orgânica presente neste material é usada como fonte de energia para o crescimento e o carbono para a síntese de biomassa celular e dos produtos do metabolismo microbiano (Silva *et al.*, 2005).

A seleção de um substrato próprio é outro aspecto chave da fermentação em estado sólido. O material sólido não solúvel pode atuar apenas como suporte físico ou ainda exercer a função de fonte de nutrientes (substrato) para a cepa. O sólido pode ser de origem natural, como produtos agrícolas, resíduos agroindustriais ou ser constituído por um suporte inerte suplementado com os nutrientes necessários a FES (Christen *et al.*, 1997; Pintado *et al.*, 1998; Dominguez *et al.*, 2003; Pandey, 2003).

Na formulação do meio de fermentação várias fontes de carbono (substrato principal) são utilizadas, entre elas cita-se (Alonso, 2001): Farelo de trigo (Silva *et al.*, 2000; Ellaiah *et al.*, 2004), farelo de arroz (Ellaiah *et al.*, 2004), farelo de cevada (Dominguez *et al.*, 2003), bagaço de cana-de-açúcar (Cordova *et al.*, 1998; Ellaiah *et al.*, 2004), torta de côco (Benjamin e Pandey, 2000), torta de soja (Vargas, 2004), torta de babaçu (Palma *et al.*, 2000; Gombert *et al.*, 1999; Castilho *et al.*, 2000), entre outros, além da incorporação opcional de alguma fonte de carbono indutora para a produção de lipases (óleos, ácidos graxos, detergentes). Em alguns casos, fontes de nitrogênio complementar são utilizadas: água de maceração de milho, extrato de levedura, uréia, sais de amônio e outros. Sais metálicos e micro-elementos podem ser suplementados para suprir as necessidades do micro-organismo (Alonso, 2001).

As tortas residuais de processos de extração de óleos são bastante usadas na indústria de alimentos para animais, por possuírem boas quantidades de proteína. Muitos estudos têm avaliado o uso das tortas de oleaginosas em bioprocessos. Aplicação biotecnológica de torta de girassol, soja, coco, mostarda, palma, algodão, canola, oliva entre outras, podem ser utilizadas para obtenção de enzimas, antibióticos, biopesticidas, vitaminas etc. Na produção de enzimas as tortas são usadas como substratos para FES ou como suplemento do meio de produção, em termos de fonte carbono e nitrogênio (Ramachandran *et al.*, 2007). A Tabela 3 apresenta alguns resíduos (substratos) utilizados para produção de lipases utilizando fermentação em estado sólido.

Tabela 3 – Resíduos utilizados para produção de lipase em FES

Resíduo	Autor	Micro-organismo
Farelo de Babaçu	Azeredo <i>et al.</i> , 2007	<i>P. restrictum</i>
Farelo de trigo	Mahadik <i>et al.</i> , 2002	<i>A.niger</i>
Farelo de soja	Agrawal <i>et al.</i> , 2004	<i>Penicillium sp.</i>
Farelo de babaçu	Cavalcanti <i>et al.</i> , 2005	<i>P. simplicissimum</i>
Bagaço de cana	Diaz <i>et al.</i> , 2006	<i>R. homothallicus</i>
Farelo de casca de trigo	Meira <i>et al.</i> , 2005	<i>Burkholderia cepacia</i>
Farelo de semente de girassol	Monteiro <i>et al.</i> , 2007	<i>P. aeruginosa</i> DAUPE 614
Farelo de trigo	Dutra <i>et al.</i> , 2008	<i>A. niger</i>

Porém, a FES geralmente é lenta, em função da barreira à transferência de massa gerada durante a fermentação. Entretanto, os processos metabólicos dos micro-organismos são influenciados pela mudança de temperatura, de pH, de substrato, do índice de umidade, do fornecimento de ar, da concentração de inóculo, etc., sendo que estas circunstâncias variam extensamente de espécie para espécie. Assim, torna-se muito importante saber as condições ambientais dos micro-organismos para a máxima produção (Ellaiah *et al.*, 2004).

Outro problema encontrado em FES está na difícil remoção do calor produzido devido à atividade metabólica microbiana. Isto ocorre devido à dificuldade de homogeneização do meio reacional, além dos problemas difusionais característicos de processos envolvendo meios sólidos (Pandey e Soccol, 2001; Sato e Sudo, 1999; Palma *et al.*, 2000; Germano, 2000; Bianchi *et al.*, 2001; Von Meien e Mitchell, 2002; Mitchell *et al.*, 2003).

Embora a FS seja amplamente utilizada na indústria para produção de enzimas por possuir vantagens que controlem o rendimento e produto, este tipo de processo pode gerar volumes altos de efluentes. Como uma alternativa, A FES foi desenvolvido para provar que é um modo econômico para produzir várias enzimas inclusive lipases e esterases. A FES é uma ferramenta promissora para a produção de metabólitos microbianos, por fazer uso de um meio barato, já que pode utilizar resíduo.

2.3.1 Suplementação do meio fermentativo

O estudo de meios fermentativos para obtenção de produtos biotecnológicos de alto valor tem sido de grande importância. A busca por composições que levem a uma maior produção enzimática é um dos principais objetivos. No entanto se faz necessário, a obtenção de meios completos, mas com o menor número de suplementos, o que nos reporta à escolha inicial do resíduo agroindustrial, no caso da FES.

A escolha do suplemento de um meio fermentativo deve levar em conta a relação de carbono/nitrogênio, quantidade de água e concentração de minerais (Rigo, 2009).

A produção de lipase é necessariamente afetada pela fonte de carbono no meio de cultura. Como substrato para produção de lipase, e crescimento microbiano, as fontes de carbono mais usuais são os carboidratos, os ácidos orgânicos, os gliceróis, outros alcoóis e ácidos graxos (Hadeball, 1991 *apud* Gonçalves, 2007).

Substratos lipídicos e seus metabólitos (ácidos graxos de cadeia longa) participam da síntese de lipases. Outros substratos, não relacionados à gordura e óleos, propiciam bom crescimento celular, mas não são bons para síntese, enquanto os substratos lipídicos, principalmente os ácidos graxos, são excelentes indutores de lipase (Lotti *et al.*, 1998; Dalmau *et al.*, 2000).

Quando o óleo de oliva é a única fonte de carbono, o micro-organismo utiliza-o de forma sequencial. Inicialmente o óleo de oliva é hidrolisado por uma pequena quantidade de lipase proveniente do próprio inóculo em glicerol e ácidos graxos. Em seguida o micro-organismo consome o glicerol liberado, ainda sem a produção de lipase. Finalmente, os ácidos graxos são consumidos com a indução da produção de uma quantidade significativa de lipases (Montesino *et al.*, 1996).

A produção de lipase extra e intracelular de *Geotrichum candidum* foi estudada por Jacobsen *et al.* (1989). A lipase extracelular foi produzida em meio de cultivo contendo peptona e a adição de óleo de oliva ou Tween 80 ao meio aumentando significativamente a produção. A produção de lipase intracelular no meio contendo óleo de oliva foi superior à de lipase extracelular, na fase inicial de crescimento celular. No entanto, a produção total de lipase extracelular foi maior do que a de lipase intracelular, com ambos os indutores da produção.

Na FES o micro-organismo não cresce somente na superfície do material sólido, mas também penetra nos espaços entre as partículas do suporte estabelecendo contato ou associação com este. Por esta razão é que os resíduos agroindustriais são empregados não somente como suporte da fermentação, mas também como fonte de nutrientes para o micro-organismo (Dominguez *et al.*, 2003).

Estudando a produção de lipases por fermentação em estado sólido, Palma *et al.* (2000) utilizaram o fungo *Penicillium restrictum* e torta de babaçu como meio basal. O meio foi enriquecido com peptona, Tween 80 e óleo de oliva verificando-se que a maior atividade lipásica (27,8 U/g em 25 horas de fermentação) foi obtida quando se utilizou a peptona como suplemento.

Cordova *et al.* (1998) investigaram o uso de bagaço de cana de açúcar e torta de oliva (resíduo da indústria de óleo de oliva) para a produção de lipases por *Rhizopus rhizopodiformis* e *Rhizomucor pusillus*. As maiores atividades enzimáticas obtidas foram de 79,6 U/g com *R. rhizopodiformis* e 20,2 U/g com *R. pusillus* respectivamente, quando se utilizou uma mistura de 50:50 dos substratos estudados.

A produção de lipases por *Penicillium simplicissimum* em meio sólido usando torta de soja como substrato foi estudado por Vargas (2004). Foi constatado que a maior produção da enzima (30 U/g em 80 horas de fermentação) ocorreu sob as condições de 27,5°C e 55% de umidade do meio levando em consideração que a torta de soja é rica em nutrientes e não necessita de adição de fontes suplementares de carbono e nitrogênio para aumentar a produção de lipases.

Conforme mostrado por Gombert *et al.* (1999), que estudaram a produção de lipase por *Penicillium restrictum* em torta de babaçu suplementada com peptona e óleo de oliva as maiores atividades foram obtidas em meio com óleo de oliva (30,3 U/g) e peptona (27,8 U/g) em 24 horas.

O uso de fontes não convencionais de carbono e nitrogênio vem crescendo nos últimos anos, como mostram os trabalhos a seguir. Águas de maceração de milho, hidrolisados proteicos, resíduos ricos em açúcares, proteínas ou material oleoso estão entre os que mais frequentemente são utilizados na produção de lipases.

O bagaço de cana de açúcar foi o substrato usado na pesquisa para produção de lipase termoestável por FES por *Rhizopus homothallicus*. A pesquisa revelou que o uso de uréia bem como, dos óleos vegetais avaliados, foram eficientes suplementos para produção de lipase através da FES, sendo o óleo de oliva, uréia e micronutrientes a composição do meio selecionado que resultou em atividade hidrolítica de 826U/g (Rodriguez *et al.*, 2006). Comportamento contrário foi verificado com a cultura de *Aspergillus niger* MTCC 2594 em torta de gergelim suplementado com ureia (5% m/m), extrato de carne e peptona, glicose e sacarose e alguns óleos vegetais não foram eficientes para aumento da produção da lipase, quando comparados ao ensaio controle (363,0U/g) (Kamini *et al.*, 1998).

Domínguez *et al.* (2003) investigaram a produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* por fermentação em estado sólido. Observou-se que o uso de materiais orgânicos como suporte para a produção de lipases além de diminuir os custos de produção da enzima proporciona maiores atividades lipásicas quando comparado ao uso de suportes sintéticos. Concluiu-se que a utilização de nozes trituradas como substrato gerou cerca de 69 U/g de atividade enzimática em 10 dias de fermentação, superando os resultados obtidos com farelo de cevada suplementado com óleo de girassol, milho e oliva. A Tabela 4 mostra alguns suplementos utilizados para maximizar a produção de lipase em FES.

Tabela 4 – Suplementos utilizados para produção de lipase em FES e FS.

Suplemento	Fermentação	Autor	Micro-organismo
5% (m/m) óleo de oliva 20% de trigo	FES	Meira <i>et al.</i> , 2005	<i>B. cepacia</i>
1% de trioleína Óleo de oliva 40 g/L	FS	Ertrugrul <i>et al.</i> , 2007	<i>Bacillus</i> sp.
Uréia 4 g/L, lactose 5 g/L	FES	Rodriguez <i>et al.</i> , 2006	<i>R. homothallicus</i>
Sacarose e trioleína	FS	Ginalska <i>et al.</i> , 2004	<i>Geotrichum</i> sp.

Segundo Deive *et al.*, (2003) meios de cultura que continham ácido oléico e tributirina propiciam bom crescimento de *Kluyveromyces marxianus*. O ácido oléico demonstrou ser uma boa fonte de carbono para a levedura, embora propiciasse aumento da biomassa, não promoveu a secreção da lipase, apesar de ter promovido o aparecimento de outras atividades enzimáticas. A tributirina, entretanto, apesar de não promover o crescimento do fungo, mostrou-se um indutor de produção de lipase. Isto foi explicado como possível preferência da enzima pra triacilgliceróis formados com ácidos graxos de cadeia curta.

Miranda *et al.* (1999) estudaram a produção de lipase por *Penicillium citrinum* utilizando um resíduo do refinamento de óleo vegetal como indutor na produção. Foi utilizado meio de cultura com 1,0% de óleo de oliva e 0,75% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e outro com 1,6% do resíduo industrial e 0,75% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Os resultados obtidos foram comparados, sendo a atividade máxima obtida com a utilização do óleo de oliva de 2,63 U/mL e com o resíduo industrial, de 5,79 U/mL. Foi avaliada ainda a influência da fonte de nitrogênio e do pH inicial no meio utilizando o resíduo industrial. O sulfato de amônio na concentração de 0,75% mostrou-se como a melhor fonte de nitrogênio obtendo-se uma atividade enzimática de 6,74 U/mL, com 1,6% de resíduo industrial no meio. O pH inicial do meio de 5,5 propiciou uma maior atividade enzimática de 5,26 U/mL, utilizando meio de cultura com 1,6% de resíduo industrial e 0,75% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

No entanto, os trabalhos de Ginalska *et al.*, (2004) e Shirazi *et al.*, (1998) mostraram que fontes inorgânicas de nitrogênio tais como nitrato de amônio e sulfato de amônio apresentou efeito inibitório para produção de lipases.

As fontes de nitrogênio mineral não demonstraram efeito significativo tanto no crescimento da levedura quanto na produção de lipase. No entanto, observou-se um aumento da produção de lipase em meios contendo determinadas fontes de nitrogênio orgânico. Maior produção de lipase foi obtida na presença de hidrolisado de caseína, mais especificamente com triptona N1 (um hidrolisado trípico de caseína, rico em aminoácidos livres e peptídeos pequenos), que se sobressaiu em relação aos outros substratos de nitrogênio orgânico mineral, a utilização desse suplemento pode ser interessante do ponto de vista tecnológico, mas possui um alto custo (Fickers *et al.*, 2004).

Um meio balanceado pode conter dez vezes mais carbono do que nitrogênio. Essa relação 10:1 garante um alto conteúdo protéico, enquanto uma relação maior,

como 50:1, favorece o acúmulo de álcool, metabólitos secundários derivados do acetato, lipídios ou polissacarídeos extracelulares. Dessa maneira, deve-se tomar o devido cuidado e atenção com a relação C/N durante o processo fermentativo (Carlile e Watkinson, 1997 *apud* Gonçalves, 2007).

Burkert *et al.*, (2002) e Maldonado *et al.*, (2002) investigaram a produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552 em frascos agitados utilizando meio de cultivo contendo peptona como fonte de nitrogênio e óleo de soja como indutor da produção e também as condições de pH inicial do meio de fermentação e a temperatura de produção da enzima. As condições otimizadas de produção da enzima foram 3,58% de peptona e 0,64% de óleo de soja, pH inicial do meio de fermentação igual a 7,0, temperatura de produção de 30°C, agitação de 250 rpm.

A adição de diferentes substratos lipídicos (óleo de girassol, de milho e de oliva) ao meio de cultura aumentou a produção de lipase em quantidades que variaram de acordo com o substrato empregado (Dominguez *et al.*, 2003).

O carbono e o oxigênio são fornecidos sob a forma de compostos orgânicos, de dióxido de carbono, de oxigênio molecular e de água. Já o nitrogênio sob a forma adequada (orgânica ou inorgânica). Os outros elementos (S, P, Mg e K) são fornecidos sob a forma de sais (Colen, 2006 *apud* Gonçalves, 2007).

O acompanhamento da produção de protease durante o processo de biosíntese da lipase em FES é um fator importante. Em média, o aumento do pH após algumas horas de fermentação é acompanhado com o aumento dos níveis de protease, comportamento provável devido à degradação de aminoácidos que liberam amônia no meio. Assim, o tipo de suplemento está diretamente correlacionado à produção e a estrutura da proteína (Palma *et al.*, 2000). A Tabela 5 apresenta alguns substratos naturais envolvidos na fermentação em estado sólido para produção de lipases.

Tabela 5 – Substratos naturais e micro-organismos envolvidos na fermentação em estado sólido para produção de lipases

Substrato	Atividade (U/g)	Micro-organismo	Referências
Farelo de soja	19,2	<i>Penicillium</i> sp.	Griebeler <i>et al.</i> (2009)
Farelo de Soja	15,2	<i>Penicillium</i> sp.	Wolski <i>et al.</i> (2009b)
Farelo de Soja	40,0	<i>P. verrucosum</i>	Kempka <i>et al.</i> (2008)
Farelo de Soja	30,0	<i>P. simplicissimum</i>	Vargas <i>et al.</i> (2008)
Torta de babaçu	30,0	<i>P. simplicissimum</i>	Gutarra <i>et al.</i> (2007)
Torta de babaçu	17,4	<i>P. simplicissimum</i>	Azeredo <i>et al.</i> (2007)
Torta de babaçu	26,4	<i>P. simplicissimum</i>	Gutarra <i>et al.</i> (2005)
Torta de babaçu	26,4	<i>P. simplicissimum</i>	Cavalcante <i>et al.</i> (2005)
Torta de soja	21,0	<i>P. simplicissimum</i>	Di Luccio <i>et al.</i> (2002)
Torta de babaçu	30,3	<i>P. restrictum</i>	Gombert <i>et al.</i> (1999)
Torta de babaçu	27,8	<i>P. restrictum</i>	Palma <i>et al.</i> (2000)
Farelo de trigo	630,0	<i>A. niger</i> NCIM1207	Mahadik <i>et al.</i> (2002)
Torta de gergelim	363,6	<i>A. niger</i> MTCC2594	Kamini <i>et al.</i> (1998)
Farelo de trigo (FT)	271,6	<i>A. niger</i> MTCC2594	Mala <i>et al.</i> (2007)
Torta de gergelim+(FT)	384,3	<i>A. niger</i> MTCC2594	Mala <i>et al.</i> (2007)
Torta de oliva	79,6	<i>R. rhizopodiformis</i>	Cordova <i>et al.</i> (1998)
Torta amêndoas	48,0	<i>R. oligosporus</i>	Ul-Haq <i>et al.</i> (2002)
Bagaço de cana	826,0	<i>R. homothallicus</i>	Rodriguez <i>et al.</i> (2006)
Bagaço de cana	1500,0	<i>R. homothallicus</i>	Diaz <i>et al.</i> (2006)
Casca de arroz	23,3	<i>C. gloesporioides</i>	Colen <i>et al.</i> (2005)
Farelo de trigo	69,0	<i>Y. lipolytica</i>	Domínguez <i>et al.</i> (2003)

Fonte: Rigo, 2009.

2.3.2 Variáveis que afetam o processo fermentativo

O processo fermentativo em estado sólido pode ser conduzido em escala laboratorial, industrial e piloto, e possui as mesmas dificuldades de controle de transferência de calor e massa, causados pela compactação do meio, criação de caminhos preferenciais, que por sua vez levam a uma aeração deficiente. No entanto,

estes problemas podem ser minimizados através de estratégias como a circulação de ar ao redor do leito do substrato e uma possível agitação moderada do leito. Cabe ressaltar, a questão da agitação deve ser examinada com cautela, uma vez que fungos que não apresentam septo nas hifas podem ser pouco resistentes à agitação mecânica (Vargas, 2004).

O material ou matriz sólida usada na FES possui baixa condutividade térmica e consequentemente a remoção do calor do processo pode ser lenta. Assim, o acúmulo de calor no decorrer da fermentação pode ocasionar a desnaturação dos produtos formados, sendo que o controle do aquecimento está relacionado com a capacidade de aeração do sistema (Pandey, 2003).

Não menos importantes são os parâmetros biológicos do processo, como, efeito da composição de nutrientes do meio em termos da fonte de carbono, nitrogênio, sais e indutores, a temperatura, valores de pH, umidade, concentração do inóculo e ainda a porosidade do meio (Rigo, 2009).

Entre os fatores limitantes da FES que requerem soluções para o escalonamento do processo destacam-se a formação de gradientes de umidade, pH, temperatura, oxigênio e distribuição do inóculo e substrato pela dificuldade de mistura (Rodriguez *et al.*, 2006; Holker e Lenz, 2005; Chen *et al.*, 2005; Couto e Sanromán, 2005; Holker *et al.*, 2004; Raghavarao *et al.*, 2003).

Na literatura há deficiência de informações com relação ao efeito de pH sobre os parâmetros de crescimento de fungos, apesar de haver consideráveis informações em relação ao efeito do pH inicial do cultivo. O metabolismo do fungo altera o pH, seja pela absorção de ânion ou cátion ou pela produção de ácidos orgânicos ou amônia. Durante o cultivo, o tamponamento é difícil de ser obtido, pois as próprias substâncias usadas como tampões podem ser assimiladas ou podem ser tóxicas naquelas quantidades que seriam necessárias para se conseguir efetivo tamponamento. Apenas em biorreatores do tipo fermentadores o pH pode ser mantido constante durante o crescimento do fungo (Gonçalves, 2007).

Em relação ao pH na produção de lipases fúngicas, em geral, a produção máxima de enzimas ocorre quando o pH atinge valores entre 7,0 e 8,0. No final da fermentação, isto é, após o esgotamento da fonte de carbono, o pH continua subindo para a faixa alcalina, provavelmente devido à proteólise que origina aminoácidos que são desaminados, liberando amônia para o caldo fermentativo. Neste estágio, a enzima

produzida é rapidamente desnaturada por proteólise ou pH adverso (Castilho *et al.*, 2000).

Em um processo industrial, a temperatura utilizada na fermentação é o fator limitante da altura do leito. Nos estágios iniciais do processo de fermentação, a temperatura e a concentração do oxigênio são iguais em todo leito. No entanto, com o decorrer do processo, surgem problemas na difusão de oxigênio e transferência de calor, por compactação e encolhimento do leito. O calor e gases gerados nas biorreações tendem a se acumular no leito, formando gradientes. Este problema é bastante complexo e pode afetar o controle de dois parâmetros fundamentais como a temperatura e o conteúdo de água no meio sólido, que por sua vez podem levar a mudanças nas condições operacionais, prejudicando o andamento do processo (Sangsurasak e Mitchell, 1998; Raghavarao *et al.*, 2003; Robinson e Nigan, 2003; Vargas, 2004).

O desenvolvimento de equipamentos que proporcionem uma boa transferência de calor é um fato importante e, em geral, em escala industrial utiliza-se o fermentador com tambor rotativo, eficiente neste aspecto (Chen *et al.*, 2005; Raghavarao *et al.*, 2003).

A porosidade do leito da fermentação em estado sólido e a área superficial são fatores investigados em pesquisa durante a fermentação com *Aspergillus oryzae* em farelo de trigo e grãos de trigo. Há uma importante relação entre a taxa de oxigênio distribuído e o espaço entre as partículas de substrato. Assim, o aumento da porosidade do leito através do uso de menores ou um maior número de partículas do substrato é uma forma de facilitar os processos de transferência durante a fermentação em estado sólido. Outro fator de extrema importância é a formação do micélio aéreo do fungo no leito do suporte, pois este possui relação direta com a velocidade de formação da enzima (Rahardjo *et al.*, 2005).

A produção de lipases de *Aspergillus niger* J-1 foi testada por Falony *et al.* (2006) usando a fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES), em um meio de cultura mineral constituído de farelo de trigo. A otimização do meio de cultura foi realizada para FS e FES. A atividade máxima de lipase, 1,46 U/mL, foi obtida durante a fermentação submersa em um meio contendo glicose a 2%(p/v) e óleo de oliva a 2%(p/v), em condições de 1vvm e 450 rpm com atividade lipolítica. 4,8 U/mL foram alcançados usando o processo de fermentação em estado sólido com um meio que continha 0,75%(p/v) de sulfato de amônia e 0,34%(p/v) de ureia. O pH e

temperatura ótimos para a atividade enzimática foram pH 6 e 40°C, sendo que a enzima apresentou 80% de sua atividade em meio neutro em temperaturas entre 20 e 30°C por um período de 24h.

Burkert *et al.* (2005) estudaram a produção de lipase em reator de mistura e em reator do tipo *airlift* utilizando *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 e meio sintético. Os resultados obtidos demonstraram uma melhor performance da produção no reator *airlift*, no qual a produtividade foi cerca de 40% maior do que no reator de mistura, comparando-se as condições ótimas de operação : 1,0 vvm para reator *airlift* e 1,0 vvm e 300 rpm para reator de mistura.

Para aumentar o desempenho da FES, alguns fatores devem ser ajustados de acordo com a especificidade da enzima e o substrato usado, facilitando a formação do micélio e contribuindo para formação da enzima hidrolítica (Rahardjo *et al.*, 2005).

2.4 PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

Diversas técnicas têm sido empregadas para a purificação de lipases, a precipitação de proteínas geralmente é usada como primeiro passo de purificação e neste caso o sulfato de amônio é o agente de precipitação mais utilizado. Outra técnica presente nos protocolos de purificação é a cromatografia (de troca iônica ou interação hidrofóbica). Esses métodos podem ser combinados para que se consiga enzimas com maior poder de catálise (Gupta *et al.*, 2004; Saxena *et al.*, 2003).

Os métodos de purificação de lipases são dependentes da cepa, dos meios e condições de cultura e das características da enzima. Como resultado desta diversidade, não há processos de purificação específicos. Assim sendo, enzimas produzidas por espécies diferentes do mesmo micro-organismo podem apresentar propriedades distintas (Gupta *et al.*, 2004).

A definição das operações de um processo de purificação depende do uso alvo e também de suas características físico-químicas e do tipo de impurezas presentes no extrato enzimático, em muitos casos purificação parcial do extrato é suficiente (Gupta *et al.*, 2004).

A formação de agregados pode ocorrer devido à presença de lipídios ou à característica hidrofóbica que a estrutura protéica da lipase apresenta.

A escolha do processo de purificação enzimática deve ser feita levando em consideração a necessidade de uma boa recuperação da atividade enzimática aliada a um alto grau de purificação. Além disso, o processo deve ser simples e barato, evitando sucessivas etapas. Em geral, a fase de purificação é a etapa que mais contribui para o custo total de obtenção de uma enzima (Maldonado, 2006).

A técnica de precipitação das proteínas com sais, aplicada como pré-tratamento do meio contendo a enzima de interesse, facilita os processos subsequentes devido à ausência de possíveis interferentes (Martins *et al.*, 2008). Esta metodologia consiste em uma das técnicas de concentração de proteínas, para separação das mesmas dos outros compostos do meio. A concentração pela adição de sais, como sulfato de amônio, baseia-se no aumento da força iônica, de tal forma que as moléculas protéicas se agregam e precipitam. O sal é adicionado ao sobrenadante até uma porcentagem de saturação em que a enzima de interesse é precipitada e separada por centrifugação. A composição do extrato, sua concentração e temperatura podem influenciar a precipitação, no caso das enzimas a temperatura deve ser mantida baixa (4°C). A adição do sal deve ser lenta e sob agitação para favorecer a homogeneidade. Após a centrifugação, o precipitado deve ser redissolvido em tampão adequado, utilizando-se um volume de aproximadamente duas vezes o volume de precipitado (Borzani *et al.*, 2001).

O processo de purificação utilizado para lipase de *Pseudomonas* sp. foi a precipitação com sulfato de amônio (80% saturação), seguida de diálise aumentando em 6 vezes o fator de purificação (Kiran *et al.*, 2008).

O sulfato de amônio é bem reportado para precipitação de lipases sendo que, as concentrações utilizadas variam de acordo com os estudos, 80% de saturação foi utilizado na precipitação de lipases produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* (Karadzic *et al.*, 2006) e *Pseudomonas fluorescens* (Makhzoum *et al.*, 1995). As várias concentrações, de sulfato de amônio usadas para aumentar o rendimento da enzima, estão sumarizadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Concentração de sulfato de amônio utilizada para aumentar o rendimento das lipases

Autor/ ano/ saturação	Fonte	Atividade do extrato enzimático	Atividade específica (U/mg de proteína)
Benjamin e Pandey (2000) (20% a 100%)	<i>Candida rugosa</i>	18,14 U	3,88
Bacha <i>et al.</i> (2005) (60%)	Pâncreas de avestruz	116,00 U	521
Sharma <i>et al.</i> (2002) (30% a 70%)	<i>Bacillus</i> sp. RSJ – 1	2425 U	44,82
Kanwar <i>et al.</i> (2002) (60%)	<i>Pseudomonas</i> sp.	14,75 U	19,46
Shu <i>et al.</i> (2006) (70%)	<i>Antrodia cinnamomea</i>	188,7 U	12,7
Kakugawa <i>et al.</i> (2002) (80%)	<i>Kurtzmanomyces</i> sp. I – 11	4,86 U	3,52
Pastore <i>et al.</i> (2003) (70%)	<i>Rhizopus</i> sp.	135,60 U	103
Jesus <i>et al.</i> (1999) (80%)	<i>Penicillium restrictum</i>	31,03 U	14,1
Abbas <i>et al.</i> (2002) (75%)	<i>Mucor</i> sp.	118,09 U	129

Fonte: Menoncin, 2007.

A avaliação do uso de diferentes concentrações de sulfato de amônio para precipitação da lipase produzida através do sistema de FES com *Penicillium verrucosum* foi estudada através planejamento experimental, abrangendo a faixa de 32 a 88% de saturação. A concentração de 60% de saturação foi apresentada como a que resultou no maior de atividade específica (0,91 U/mg) após 5 horas de precipitação a temperatura ambiente (25°C). Deve-se ressaltar ainda que, o processo de diálise não apresentou efeito no aumento da atividade da proteína em relação à precipitada (Menoncin *et al.*, 2008).

Apesar da importância do estudo da purificação da enzima é preciso considerar que por mais adequado que seja o processo escolhido, este sempre vai causar alterações na enzima. Redução da atividade enzimática, alterações de temperatura e pH ótimo de atuação e de estabilidade são algumas das características que podem ser afetadas com o processo de purificação (Maldonado, 2006).

2.5 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

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

A aplicação de enzimas nos processos industriais é uma realidade, entretanto, devido a sua natureza protéica são facilmente desnaturáveis e sua produção em larga escala com finalidade industrial torna seu custo elevado (Rodrigues, 1997).

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, a técnica da imobilização é utilizada para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização (Villeneuve *et al.*, 2007).

No geral, os métodos mais utilizados para imobilização de enzimas são: adsorção, a oclusão da proteína no interior do polímero (Powell, 1990).

O processo de oclusão consiste no aprisionamento de uma enzima em uma matriz polimérica ou em uma membrana semipermeável, de tal forma que se permita a penetração do substrato e difusão dos produtos e impeça a liberação da proteína, conservando integralmente sua estrutura (Coughlan *et al.*, 1988 *apud* Rodrigues 1997).

No processo de adsorção, a fixação da proteína é puramente física, ou seja, a proteína adere à superfície de um suporte inerte, por meio de ligações hidrofóbicas, ligações eletrostáticas e força de Van der Waals. A metodologia de adsorção de enzimas é um processo simples e de fácil execução, porém cabe ressaltar que, sua maior desvantagem é que durante o processo de lavagem a enzima pode desorver do suporte (Kemeny e Challacombe, 1988).

Outro benefício desta tecnologia é a possibilidade do desenvolvimento de processos contínuos, aumentando a produtividade e reduzindo os custos de produção (D'Souza, 2006 *apud* Brígida, 2006). Frente ao aumento da estabilidade promovido à enzima pela imobilização, outra aplicação que tem sido amplamente estudada é seu uso em reações promovidas em meios não convencionais, como solventes orgânicos, sistemas bifásicos, fluidos supercríticos e meios sólidos (Vermuë e Tramper, 1995; Gupta e Roy, 2004).

A utilização de enzimas imobilizadas em solventes orgânicos faz com que seja possível a eliminação de subprodutos em reações de hidrólise e a ajuda no equilíbrio termodinâmico na reação de esterificação (Carta *et al.*, 1992 *apud* Rodrigues 1997).

2.5.1 Imobilização em Accurel

As imobilizações por adsorção são usualmente realizadas pela incubação do suporte e da enzima em tampão ou pela precipitação da lipase com solventes, como acetona, sobre a superfície do suporte. Ao contrário do que ocorre com outras proteínas, a adsorção de lipases é favorecida em meios com baixa força iônica (Bastida *et al.*, 1998).

É preferível o emprego de suportes hidrofóbicos em relação aos suportes hidrofílicos para a imobilização de lipases devido à tendência dos suportes hidrofílicos competirem pela água disponível no meio reacional. Além disto, a quantidade de enzimas adsorvidas em tais suportes é geralmente maior e são obtidas atividades enzimáticas mais elevadas. As resinas poliméricas como Accurel EP 100 (atualmente Accurel MP 1000), constituídas por polipropileno, e materiais contendo grupos hidrófobos de ligações como octil-agarose são exemplos de suportes que vêm se destacando como sendo apropriados à imobilização das lipases (Villeneuve *et al.*, 2000).

Dentre os trabalhos encontrados na literatura pode-se citar o de Kaewthong et al. (2005) os autores, imobilizando a lipase PS (Amano) em diferentes suportes, obtiveram rendimentos de 37,16% utilizando Accurel EP100 (<200 µm), na imobilização em Accurel EP 100 (200-400 µm) o rendimento encontrado foi de 31,10%, em carbonato de cálcio obtiveram rendimento de 0,79%, em Celite rendimento de 3,56%, em Sílica Gel o rendimento foi de 6,42% e em Carvão Ativado rendimento de 0,36%. Já Bryjak e

Trochimczuk (2006), na imobilização de lipase de *Candida rugosa* por adsorção em suportes acrílicos, encontraram rendimento máximo de 25,4%. Em termos de retenção de atividade, Knezevic *et al.* (2002), imobilizando lipase de *Candida rugosa* em diferentes concentrações de alginato, obtiveram retenção máxima de 79,99%.

No processo de imobilização por adsorção, tanto a quantidade de enzimas adsorvidas quanto a orientação em que estas são imobilizadas afetam sua atividades e estabilidade (Nakanishi *et al.*, 2002). Logo, além de avaliar a quantidade adsorvida, é necessário determinar os valores de atividade recuperada (atividade retida no suporte frente à diferença na atividade do sobrenadante antes e após a imobilização) e rendimento (diferença na atividade do sobrenadante antes e após a imobilização frente à atividade oferecida para a imobilização) obtidos para um dado processo de imobilização (Gitlesen *et al.*, 1997).

2.5.2 Imobilização em Alginato de sódio e Carvão ativado

A imobilização via inclusão ou microencapsulamento consiste em confinar a enzima em um polímero insolúvel (envolvido em fibra ou gel) ou em uma microcápsula (microencapsulamento). Desta forma, moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas, como subprodutos e produtos, difundem-se. A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima interage quimicamente com o polímero, evitando, assim, a desnaturação. Contudo, a velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana, bem como a massa molar dos mesmos, são fatores limitantes (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004; Kennedy *et al.*, 1988; Gonçalves, 2007; Brígida, 2006).

O encapsulamento celular representa um método promissor para várias proteínas e antibióticos. A biocompatibilidade das microcápsulas é claramente importante, bem como os requerimentos para ótima biocompatibilidade, incluindo uma ótima microgeometria da estrutura da membrana, um procedimento de encapsulamento com uma ótima capacidade para envolver as células com grânulos perfeitos e o uso de materiais apropriados (Orive *et al.*, 2002).

Polímeros naturais e sintéticos são utilizados como suporte na imobilização de inúmeros tipos de recheio incluindo proteínas, enzimas, micro-organismos, aditivos

alimentícios, pesticidas e compostos com atividade farmacológica. Alguns polímeros gelificam por gelificação iônica, gelificação térmica ou por uma combinação desses dois mecanismos. A preparação de microcápsulas através da gelificação iônica envolve a gelificação de uma solução polimérica aquosa com um íon de baixa massa molar, onde polieletrólitos de cargas opostas interagem formando um complexo. Mediante essa técnica, o material de recheio é extrusado como gota dentro de uma solução, formando uma gota gelificada (Rocha e Grosso, 2006).

Entre os hidrocoloides utilizados na forma de microcápsulas, encontram-se pectinas de baixo teor de esterificação, carragena e alginato de cálcio, todos requerendo um íon para a reticulação da matriz. A principal vantagem do gel de alginato é sua habilidade de ser termoestável, podendo ser armazenado à temperatura ambiente (Rocha e Grosso, 2006).

O alginato pode ser considerado como da família dos co-polímeros desde a fração e sequência de dois monômeros, α -L- ácido galurônico (G) e β -D-ácido manurônico (M), variar sobre uma larga taxa (Draget *et al.*, 1997). O alginato tem sido o polímero mais utilizado para encapsulação celular (Orive *et al.*, 2002). Com a adição de glutaraldeído a enzima se torna mais estável, ou seja, mantém seu potencial catalítico por mais tempo.

Dentre os fatores que contribuem para a queda de potencial catalítico durante os consecutivos ciclos destaca-se: desprendimento da enzima do suporte, desativação da enzima pelo substrato; obstrução dos poros por impurezas ou produtos secundários; perda do suporte por atrito ou dissolução; obstrução do leito fixo causando canais preferenciais e crescimento de micro-organismo (Brígida, 2006).

2.6 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

A caracterização bioquímica das enzimas ganha destaque por fornecer dados para compreender a atuação e as alterações ocorridas, além de fornecerem dados que devem ser considerados no momento da aplicação da enzima em um processo. Temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e com pH, os efeitos da utilização de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na obtenção da enzima, e outros parâmetros são decisivos na hora do dimensionamento de um processo enzimático (Rigo, 2009; Maldonado 2006).

Estudos sobre o mecanismo de ação das lipases visam auxiliar pesquisas sobre reações específicas de interesse comercial na produção de novos compostos

biotecnológicos. O potencial de produção de ésteres com lipases produzidas através da FES sem aplicação preliminar de processos de extração e purificação vêm sendo pesquisados para uso em reações biocatalíticas, como a síntese do etil oleato avaliado por Ruiz *et al.*, (2004), com possibilidade de aplicação para produção sustentável de produtos como o biodiesel de óleos vegetais. Contudo, as lipases devem ser selecionadas para cada aplicação, sendo que estas podem ser baseadas na especificidade do substrato, posição e estereoespecificidade, bem como, temperatura e pH de estabilidade (Carvalho *et al.*, 2008).

2.6.1 Estabilidade

A viabilidade de aplicação industrial de catalisadores está diretamente ligada a dois fatores principais: potencial catalítico frente à reação em estudos e estabilidades a variáveis de processos como pH e temperatura (Illanes, 1999 *apud* Brígida, 2006).

A estabilidade térmica é a capacidade que a enzima solúvel ou imobilizada possui de manter seu potencial catalítico quando submetida a uma dada temperatura por um dado tempo (Arroyo *et al.*, 1999).

Outro parâmetro de estabilidade que deve ser avaliado para os biocatalisadores é a estabilidade à estocagem. O biocatalisador, quando estocado em condições favoráveis de temperatura, tende a manter seu potencial catalítico (Brígida, 2006).

Fungos termofílicos e termotolerantes podem ser fonte potencial para produzir enzimas com altos níveis de estabilidade térmica e atividade a temperaturas mesofílicas. As lipases extracelulares purificadas produzidas pelo fungo termotolerante *Rhizopus homothallicus* em FES e FS, apresentaram máxima atividade a 40°C e 30°C, respectivamente. A avaliação da estabilidade térmica a 50°C resultou em tempo de meia-vida de 0,72h e 0,44h para os sistemas de FES e FS, respectivamente (Diaz *et al.*, 2006).

Já o extrato pré-purificado através da técnica de precipitação com sulfato de amônio (60% saturação), produzido também em FES com farelo de soja fermentado com *Penicillium verrucosum*, apresentou os valores ótimos, de pH 8,5 e temperatura 42 °C (Menoncin *et al.*, 2008).

A lipase de *Aspergillus carneus* foi purificada por cromatografia de interação hidrofóbica obtendo-se um fator de purificação de 24 vezes e uma recuperação da atividade de 38%. A enzima apresentou pH e temperatura ótimos de 9,0 e 37°C, respectivamente. Foi estável na faixa de pH 8 a 10 por 24 horas e por 5 minutos à temperatura de 70°C (Saxena *et al.*, 2003).

2.6.2 Especificidade

Em sua estrutura a lipase possui a presença de uma tampa ou válvula, composta de uma ou duas sequências peptídicas em α hélice, que cobre o sítio ativo (Paiva *et al.*, 2000; Pleiss *et al.*, 1998). Quando há ligação do substrato na superfície da enzima, esta move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, com o centro ativo acessível ao substrato. Ao mesmo tempo em que o centro ativo fica acessível, uma larga superfície hidrofóbica é exposta, facilitando a ligação da lipase à interface (Jaeger e Reetz, 1998; Pleiss *et al.*, 1998).

A interação da área que rodeia o sítio ativo com superfícies hidrofóbicas pode modificar propriedades funcionais da lipase. Contudo, a presença da tampa não implica dizer que necessariamente será observado o fenômeno de ativação interfacial, algumas lipases oriundas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e do tipo B de *Candida antarctica* que apresentam tampa em suas estruturas, mostraram não sofrer a ativação interfacial (Jaeger e Reetz, 1998).

Quanto ao mecanismo de atuação da hidrólise de ésteres de uma α/β hidrolase, este se inicia com um ataque nucleofílico ao átomo carboxílico da ligação éster pelo oxigênio da serina do sítio catalítico. Posteriormente, há formação de um intermediário tetraédrico, o qual é estabilizado pelas ligações de hidrogênio a átomos de nitrogênio de resíduos da cadeia principal pertencente à cavidade de oxiânion (Jaeger e Reetz, 1998) – uma região em torno do resíduo de serina criada pela reestruturação da lipase (Paiva *et al.*, 2000). Após a formação do complexo acil-lipase, um álcool é liberado. Finalmente, o complexo acil-lipase é hidrolisado, liberando ácidos graxos e regenerando a enzima (Jaeger e Reetz, 1998).

Contudo, sob condições microaquosas, elas são capazes de catalisar a síntese de ésteres a partir de um álcool e ácido carboxílico. Uma combinação destes dois processos

básicos em sequências lógicas pode resultar em reações de interesterificações (acidólise, alcoólise ou transesterificação, a depender dos reagentes de partida) (Castro *et al.*, 2004).

A atividade hidrolítica em diferentes triacilgliceróis (C4:0 – C18:2), metil ésteres (C12:0 – C18:1) e óleos e gorduras foram estudados em sistemas aquosos usando lipase de *Bacillus stearothermophilus* SB-1 e *Burkholderia cepacia* RGP-10. As lipases de ambas culturas apresentaram seletividade por alguns óleos ricos em ácidos graxos insaturados, bem como a triglicerídeos de cadeia média (C14:0) para *B. stearothermophilus* SB-1 e longa (C18:2) para *B. cepacia* RGP-10. As mesmas culturas liofilizadas tiveram a atividade de esterificação avaliada frente a diferentes ésteres graxos sendo os ésteres de cadeia média (C14:0) e cadeia longa (C18:1) para cada lipase citada como os que resultaram em maior percentual de atividade de síntese (Bradoo *et al.*, 2002).

A influência de diferentes fontes de lipídios para uso como substrato da reação de hidrólise com lipase de *Aureobasidium pullulans* HN2.3, foram pesquisadas por Liu *et al.*, (2008), buscando verificar de forma ampla a possibilidade de aplicação, através do uso de substratos naturais como gordura animal (banha) e alguns óleos vegetais como de amendoim, soja e oliva. Os resultados revelaram que a lipase purificada foi hábil ao hidrolisar todas fontes de lipídios propostas no estudo, sendo a maior atividade obtida com óleo de amendoim (106 U/mg proteína), seguida por óleo de oliva, banha e óleo de soja (58, 51 e 43 U/mg proteína), respectivamente. Da mesma forma, a lipase bruta alcalina obtida através da FES com fungo *Colletotrichum gloesporioides*, apresentou na tributirina maior atividade, seguida de óleo de canola, soja, girassol e milho, sendo a menor atividade observada em gordura animal (Colen *et al.*, 2006). Estes resultados asseguram o potencial de aplicação das lipases produzidas, em reações de degradação e reuso dos materiais gordurosos naturais usados na avaliação da especificidade da reação enzimática (Liu *et al.*, 2008) e ou na obtenção de produtos biotecnológicos de interesse.

2.7 LIPASE NA SÍNTESE DE BIODIESEL

Na última década, o mundo voltou o foco das atenções para os combustíveis renováveis, resultando em uma explosão de estudos científicos e no aumento crescente do número de artigos publicados, com o objetivo de desenvolver novos métodos de produção bem como o aperfeiçoamento de métodos analíticos existentes para monitoramento da qualidade do biocombustível produzido (Rampim, 2007).

Pesquisas recentes sobre a produção de biodiesel têm sido apresentadas na literatura: na Europa investigam-se os ésteres obtidos a partir de óleo de canola; na Malásia ésteres do óleo de palma; ésteres do óleo de soja também têm características potenciais para uso como diesel alternativo, existindo muitas pesquisas nesta área. Embora eficiente em termos de rendimento da reação e tempo, a abordagem química para sintetizar alquil-ésteres de triglicerídeos possui severos inconvenientes, incluindo dificuldades na recuperação do glicerol, a necessidade de remover o sal residual e a intensiva energia natural do processo. Por outro lado, o uso de biocatalisadores permite a síntese específica de alquil-ésteres, fácil recuperação do glicerol e transesterificação de glicerídeos com grande quantidade de ácido graxo (Asano *et al.*, 2002).

Dentre as oleaginosas já investigadas para a produção de biodiesel, figuram a soja, o girassol, a mamona, o milho, a canola, o babaçu, o buriti, o dendê, o amendoim, entre outras (Ma e Hanna, 1999). No entanto, a escolha da oleaginosa a ser utilizada deve considerar o teor em óleo vegetal, produtividade e adaptação territorial (Ramos *et al.*, 2003). Observando-se os aspectos tecnológicos e econômicos, é de fundamental importância que se tenha uma visão geral da potencialidade dos óleos vegetais na produção de biodiesel.

A transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais, também denominada de alcoólise, pode ser conduzida por uma variedade de rotas tecnológicas, em que diferentes tipos de catalisadores podem ser empregados (Ramos *et al.*, 2003).

O surgimento da transesterificação é datado de 1846, quando Rochieder descreveu a produção de glicerol pela etanólise de óleo de mamona. Desde aquele momento, o processo de alcoólise tem sido largamente estudado (Demirbas, 2003).

De acordo com Srivastava e Prasad (2000), a transesterificação consiste na reação de um triglicerídeo (TG) com um álcool, resultando na produção de 3 moles de ésteres e 1 mol de glicerol (GL).

A catálise química (ácida ou básica) é a técnica mais utilizada na reação de transesterificação, pois permite, no caso da catálise alcalina, a obtenção de altas conversões em baixos tempos de reação, como relatam estudos na literatura (Freedman *et al.*, 1986; Nouredini e Zhu, 1997; Darnoko e Cheryan, 2000; Faccio, 2004; Martinez, 2005; Oliveira *et al.*, 2005).

O método químico, embora de concepção simples, rápido e com altos rendimentos apresenta vários inconvenientes, tais como, custos com catalisador e dificuldade de purificação e separação dos produtos da reação, o que implica em altos custos de produção e energia (Kusdiana e Saka, 2001).

O método enzimático é tradicionalmente conduzido na presença de solventes orgânicos, visando minimizar problemas de transferência de massa e imiscibilidade entre as fases, requerendo, no entanto, a utilização de elevadas razões solvente/óleo vegetal.

Um estudo da produção de ésteres etílicos de soja utilizando a enzima comercial Lipozyme IM e n-hexano como solvente, apresentado por Faccio (2004), reportou 96% de conversão, utilizando uma razão óleo:solvente de 1:40, em aproximadamente 5 horas de reação.

De maneira geral, alguns fatores interferem no rendimento da reação de transesterificação, dentre os quais podem ser citados:

- a. Tipo de catalisador: catalisadores usados para transesterificação de triglicerídeos são classificados em químicos (alcalinos e ácidos) e enzimáticos, homogêneos ou heterogêneos.
- b. Tempo de reação: para reação de transesterificação, o tempo necessário para atingir altas conversões depende do tipo de catalisador utilizado. Para sistemas utilizando catalisadores químicos, a completa conversão do sistema é geralmente atingida em torno de 20 minutos de reação (Faccio, 2004). No método enzimático com solventes orgânicos, a reação atinge conversão máxima em 5 horas de reação (Faccio, 2004). Dalla Rosa (2006) obteve conversão completa em 2 horas de reação, utilizando enzimas em fluidos pressurizados.
- c. Temperatura de reação: cada metodologia indica uma temperatura ótima para que a reação de transesterificação ocorra de maneira satisfatória. Segundo

Darnoko e Cheryan (2000), a temperatura ótima para a reação utilizando catalisadores químicos situa-se próxima à temperatura normal de ebulição do álcool a ser utilizado na reação. Em relação a sistemas enzimáticos, a temperatura ótima de operação é função da enzima a ser utilizada como catalisador da reação (Nascimento *et al.*, 2004).

- d. Razão molar óleo:álcool: uma das mais importantes variáveis que afetam o rendimento em ésteres é a relação molar entre o álcool e o triglicerídeo. A estequiometria da reação de transesterificação requer três moles do álcool e um mol do triglicerídeo para obter três moles de ésteres do ácido graxo e um mol de glicerol. Porém, um excesso de álcool é utilizado a fim de deslocar o equilíbrio da reação, no sentido de favorecer a formação dos produtos da reação. Altas razões molares resultam em elevadas conversões em ésteres em curtos tempos de reação (Ma e Hanna, 1999). Em sistemas enzimáticos uma quantidade de álcool em excesso causa efeito de inibição por substrato na reação, diminuindo os níveis de conversão (Noureddini *et al.*, 2004).
- e. Teor de ácidos graxos livres e água: o rendimento da reação é afetado diretamente pelo teor de ácidos graxos livres e água, quando a mesma é conduzida por intermédio de catalisadores básicos. Uma vez que parte do catalisador é utilizada para neutralizar os ácidos graxos livres e a água pode levar à formação de ácidos graxos, reduzindo a eficiência da reação.
- f. Intensidade de mistura: a natureza das duas fases óleo/álcool requer vigorosa agitação para proceder à reação de transesterificação (Kusdiana e Saka, 2001). Sistemas de agitação são normalmente aplicados para aumentar o contato entre os reagentes, resultando no acréscimo na taxa de transferência de massa, o que interfere diretamente no rendimento da reação (Noureddini e Zhu, 1997).

2.8 CARACTERIZAÇÃO DOS CATALISADORES

Os métodos de caracterização podem fornecer informações a respeito das superfícies dos materiais e ajudar a compreender melhor a cinética das reações. Entretanto, uma única técnica de caracterização não pode fornecer isoladamente

todas as informações necessárias a respeito de suas propriedades. A interpretação do conjunto de resultados obtidos pelas diferentes técnicas de caracterização pode tornar possível o entendimento e compreensão das estruturas, reatividades, forças e quantidades de sítios básicos nas superfícies dos catalisadores estudados.

A análise textural dos catalisadores é realizada por meio de dados de adsorção/dessorção de N_2 (isotermas de adsorção). Esta técnica permite obter informações sobre a área superficial do material e obter sua distribuição de tamanhos de poros. O cálculo da área superficial se realiza utilizando o método BET (Brunauer, Emmett, Teller).

Esta técnica tem sido empregada por vários autores para a caracterização de catalisadores aplicados na produção de biodiesel.

Park *et al.* (2009) utilizaram o método BET para caracterizar o catalisador WO_3/ZrO_2 utilizado para promover a esterificação de óleos vegetais para a produção de biodiesel.

Liu *et al.* (2008a) também empregaram a análise textural através da adsorção de N_2 para caracterização do catalisador metóxido de cálcio utilizado para a produção de biodiesel metílico de óleo de soja.

Noiroj *et al.* (2008) estudaram a transesterificação do óleo de palma para a produção de metil ésteres usando KOH impregnado em Al_2O_3 e a zeólita NaY como catalisadores. Os autores utilizaram diversos métodos de caracterização do catalisador, dentre estes a área superficial, determinado pelo método BET.

2.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na revisão bibliográfica apresentada neste capítulo procurou-se relatar o estado da arte a respeito da produção de lipase, suas características e sua aplicação na síntese de biodiesel.

Verifica-se que, dependendo do micro-organismo usado na fermentação e do tipo de fermentação, a lipase obtida possui uma especificidade em particular. As inúmeras variáveis que envolvem o processo de obtenção da enzima vão desde a composição do meio até as condições operacionais como pH, temperatura, forma de condução do processo e estabilidade quando armazenadas a baixas temperaturas são de extrema importância para determinar suas possíveis aplicações.

2 Revisão Bibliográfica

A concentração da lipase é utilizada como uma etapa inicial de isolamento, sendo a concentração com sulfato de amônio a mais utilizada, para posterior purificação ou imobilização, obtendo-se assim enzimas mais estáveis, facilitando sua recuperação e reutilização.

Contudo é de grande importância a execução de estudos na busca de processos e condições apropriadas, visando maior conhecimento do processo e obtenção de condições ótimas de produção, e de meios de baixo custo que não interfiram no crescimento do micro-organismo. A caracterização da enzima é de suma importância, pois possibilita um maior conhecimento das propriedades da enzima obtida o que favorece suas possíveis utilizações nos processos industriais e de síntese.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais, procedimentos experimentais e a metodologia analítica utilizados para o desenvolvimento do estudo relacionado à produção e caracterização de lipases extracelulares obtidas por fermentação em estado sólido (FES) em farelo de mamona e torta de babaçu com *Penicillium verrucosum* e *Penicillium brevicompactum*.

3.1 MATERIAIS

Os principais reagentes e meios de cultura utilizados no decorrer deste trabalho foram:

- Acetona (Quimex);
- Albumina (Sigma A3294);
- Ácido sulfúrico concentrado (Quimex);
- Ácido bórico (Nuclear);
- Biftalato de Potássio (Nuclear);
- Butanol seco (máx. 0,005% H₂O) (Merck);
- Comassie Brillante Blue G (Sigma);
- Etanol 95% (Quimex);
- *n*-hexano (Nuclear);
- Farelo de mamona (Petrobras) e torta de babaçu (Tobasa S/A);
- Fenolftaleína (Nuclear);
- Fosfato de sódio monobásico (Vetec);
- Fosfato de sódio dibásico (Vetec);
- Goma acácia (arábica) (Synth);
- Hidróxido de sódio (Nuclear);
- Meio BDA (Batata, dextrose, Agar, composição após o preparo (39 g em 1 L): 4 g/L de infusão de batata, 20 g/L de glicose e 15 g/L de ágar) (Acumedia);
- Metanol seco (máx. 0,005% H₂O) (Merck);

- *n*-propanol (Vetec)
- Óleo de oliva (Arisco, acidez < 0,5%), óleo de soja (Soya);
- Pastilha catalisadora (sulfato de potássio e selênio) (Velp Científica);
- Sulfato de amônio (Synth);
- Tween 80 (Vetec);
- Uréia (Synth).

3.2 EQUIPAMENTOS

Os principais equipamentos utilizados neste estudo foram os seguintes:

- Agitador orbital (Marconi MA-410);
- Agitador magnético (Fisatom);
- Banho agitador (Nova Ética);
- Balança analítica (Bel Engineering);
- Câmara de fluxo laminar (Pachane);
- Centrífuga Hettich (modelo Mikro 20);
- Centrífugas refrigeradas (Nova Técnica);
- Dessecador com sílica (Vidralabor, Thermex);
- Destilador Kjeldahl (Marconi, modelo MA036);
- Extrator de Soxhlet (Marconi, modelo MA491);
- Espectrofotômetro (Agilent Technologies 8453);
- Estufa com circulação de ar (Fanem, modelo 320SE);
- Freezer -80°C (Hitachi);
- Germinadora para incubação (Tecnal TE-401);
- Liofilizador (Edwards Modulyo);
- Micro-ondas Philco (modelo PMW 110);
- Microscópio (Leica);
- Medidor de pH digital (Gehaka, modelo PG2000);
- Mixer manual (Black & Decker);
- Titulador automático (Mettler Toledo DL 50 Graphix).

3.3 MÉTODOS

Nesta seção serão apresentadas detalhadamente as metodologias experimentais empregadas para obtenção de lipases extracelulares com atividade de hidrólise e síntese, através da fermentação em estado sólido (FES) em farelo de mamona e torta de babaçu com micro-organismos selecionados. De forma sucinta, podem-se seccionar as etapas da pesquisa nos seguintes itens:

Estudo da produção de lipase com atividade hidrolítica e de síntese

- a) Avaliação cinética da produção de lipase hidrolítica através das cepas de *Penicillium verrucosum* e *Penicillium brevicompactum*.
 - Suplementação do farelo de mamona e torta de babaçu com óleo de soja, uréia e resíduos agroindustriais (melaço de cana de açúcar).
 - Avaliação do efeito da umidade e concentração do suplemento na produção da lipase.
- b) Caracterização bioquímica da lipase com atividade hidrolítica e de esterificação
 - Concentração do extrato enzimático através da precipitação com sulfato de amônio.
 - Determinação da estabilidade da lipase bruta e pré-purificada liofilizada, em baixas temperaturas.
- c) Avaliação da especificidade dos extratos enzimáticos com atividade de esterificação
 - Alcoóis Metanol, etanol, n-propanol e butanol
 - Ácidos láurico (C12:0), oleico (C18:1) e butírico (C4:0)
- d) Avaliação da especificidade dos extratos enzimáticos com atividade de hidrólise a diferentes substratos.
 - Especificidade a diferentes triglicerídeos como óleo de oliva, óleo de mamona, óleo de pinhão manso, óleo de dendê, óleo de côco, tributirina e óleo de soja.

3.3.1 Micro-organismos

Os fungos *Penicillium verrucosum* e *Penicillium brevicompactum* foram isolados previamente por Freire (1996) a partir do flotado da fermentação natural das amêndoas de babaçu. Estes fungos foram selecionados como bons produtores de lipases utilizando-se metodologias de seleção em meio sólido e líquido descrito na literatura (Freire, 1996).

3.3.2 Manutenção das Cepas

As cepas isoladas foram crescidas em meio BDA durante sete dias a 30°C e então as colônias foram raspadas usando alça de platina e adicionadas em tubos com solução aquosa estéril contendo 50% de glicerina bi-destilada (87% pureza), Tween 80 (0,1% v/v) e NaCl (0,9% m/v). A solução contendo os esporos foi transferida para criotubos de 1,5 mL estéreis e conservada a -18°C. A propagação de esporos para posterior fermentação foi feita por um período de 7 dias a 27°C.

3.3.3 Fermentação em Estado Sólido (FES)

Como segunda etapa, as cepas foram inoculadas em farelo de mamona e torta de babaçu, baseando-se nas condições estabelecidas pelo planejamento de experimentos. Após a fermentação avaliou-se a atividade hidrolítica no extrato aquoso bruto e extrato precipitado liofilizado e a atividade de esterificação no extrato bruto e extrato precipitado, ambos liofilizados.

3.3.3.1 Inóculo

O meio para produção do inóculo dos fungos constituiu de frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio (BDA). O meio esterilizado foi inoculado com 0,5 mL de suspensão de esporos obtida a partir de estoques, sendo então incubado por

sete dias a 27°C. A coleta dos esporos foi realizada adicionando-se 10 mL de solução aquosa de Tween 80 (0,1% v/v) e pérolas de vidro estéreis ao frasco para uma melhor remoção dos mesmos.

A suspensão resultante foi armazenada a 4°C até sua utilização, por um tempo máximo de 15 dias. Para contagem dos esporos, 1 mL da suspensão era retirado assepticamente e diluído de 10 a 1000 vezes em solução aquosa estéril de Tween 80 (0,1% v/v). A suspensão resultante foi transferida para câmara de Neubauer (Prolab) para contagem dos esporos. A concentração da suspensão foi ajustada para se alcançar $1,5 \times 10^7$ esporos/g de substrato seco (Freire, 1996).

3.3.3.2 Obtenção de Substrato-Suporte

Os substratos-suporte utilizados no processo fermentativo para produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES) foi o farelo de mamona e torta de babaçu. A torta de babaçu é o resíduo da extração de óleo de babaçu e foi obtida da Indústria Tobasa (Palmas, TO). A torta de mamona foi obtida da Petrobras. Ambas as tortas foram estocadas a -15°C e foram utilizadas como recebidas.

A caracterização dos farelos foi realizada determinando-se a umidade, nitrogênio (NKT), gordura, cinzas, minerais e ácidos graxos totais e específicos, conforme descrição no item 3.3.3.3. A análise da umidade antecedia cada etapa experimental de fermentações buscando a padronização deste conteúdo no meio.

3.3.3.3 Composição físico-química do farelo de mamona e torta de babaçu

Neste item será apresentada a metodologia utilizada na caracterização físico-química dos resíduos agroindustriais utilizados na produção da enzima.

3.3.3.3.1 Determinação do teor de ácidos graxos totais

O teor de óleos e graxas dos farelos foi determinado por extração em Soxhlet pelo princípio da extração contínua a quente, utilizando n-hexano como solvente, segundo procedimento padrão (IAL, 1985). O papel de filtro contendo 3 g de amostra foi empacotado e colocado em cartucho de extração previamente seco em estufa a 105°C por 15 min. O cartucho foi colocado no extrator e iniciava-se a extração com n-hexano por 1,5 h em sistema de extração repetida (Marconi). O solvente foi recuperado e o copo contendo as gorduras extraídas foi seco em estufa a 105°C por 1,5 h, resfriado em dessecador por 30 min e, então, pesado. O teor de óleos e graxas foi calculado através da Equação 1.

$$AGT = \frac{(B - A) \times 1000}{C} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

AGT= Ácidos Graxos Totais (mg/g);

B= Massa do conjunto balão + resíduo de óleos e graxas seco (mg);

A= Massa do balão vazio seco (mg);

C= Massa do farelo de soja (g).

3.3.3.3.2 Determinação de gorduras pelo método de Bligh-Dyer (1959)

Esse método é utilizado para extrair todas as classes de lipídeos e não unicamente os neutros; devido ao seu método de extração ser a frio é possível determinar a composição dos ácidos graxos (Bligh e Dyer, 1959). A amostra (3g) foi transferida para erlenmeyer de 100 mL e adicionou-se 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada, tampando hermeticamente. Colocou-se os tubos em agitador rotatório por 30 minutos, e em seguida adicionou-se exatamente 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução de sulfato de sódio 1,5%. Tampou-se e agitou-se por mais 2 minutos. As amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por 2 minutos, para

acelerar a separação das camadas. Retirou-se 13 mL da camada inferior (clorofórmio) e colocou-se num erlenmeyer de 50 mL. Adicionou-se 1 g de sulfato de sódio anidro, tampou-se e agitou-se para remover os traços de água. Filtrou-se rapidamente num funil usando papel filtro e mediu-se exatamente 5 mL do filtrado e colocou-se em estufa a 100°C, até evaporar o solvente.

As amostras condicionadas como descrito anteriormente foram tratadas com BF₃/MeOH (AOCS, 1990) a fim de derivatizar todos os ácidos graxos (mono-, di- e triglicerídeos, ácidos graxos livres e ésteres etílicos) em seus correspondentes ésteres metílicos, e analisadas conforme condições cromatográficas descritas pela EN 14103 (2001). Para avaliar a porcentagem de decomposição, admitiu-se que o ácido palmítico não era passível de degradação, considerando sua alta estabilidade (He *et al.*, 2007; Imahara *et al.*, 2007).

3.3.3.3 Determinação de Nitrogênio Kjeldahl Total (NKT)

A determinação do teor de Nitrogênio Kjeldahl Total (NKT) foi feita por método padrão (IAL, 1985). A amostra (1 g) foi digerida em meio ácido (12 mL de H₂SO₄ concentrado) na presença de 1 pastilha de 3,5 g sulfato de potássio e 3,5 g selênio durante 4 h. Após neutralização com 40 mL de NaOH (40% m/v), 75 mL de água destilada foram adicionados. A amônia formada foi destilada e absorvida em 25 mL de ácido bórico (4% m/v) sendo, em seguida, titulada com HCl 0,1M. A concentração de nitrogênio foi determinada através da Equação 2, sendo que para obtenção do o teor de proteína é necessário multiplicar o valor de NKT encontrado pelo fator 6,25.

$$NKT = \frac{14,01 \times Va \times N}{P \times 10} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

NKT= (%) Nitrogênio Kjeldahl total;

Va= Volume de HCl gasto na titulação da amostra (mL);

N= normalidade da solução de HCl padronizado (0,1N);

P= massa da amostra usada na análise (g).

3.3.3.3.4 Umidade

Foi pesado 0,5 g da amostra em cápsula de porcelana, previamente seca em estufa a 105°C, até massa constante. O material contendo a amostra foi aquecido em estufa 105°C por 3 h, resfriado e pesado; repetindo-se a operação de aquecimento, com duração de meia hora, até obtenção de massa constante.

3.3.3.3.5 Minerais

O método fundamenta-se na perda de peso que ocorre quando o produto é incubado a 500-550°C, com a destruição da matéria orgânica, sem decomposição dos constituintes do resíduo mineral ou perda por volatilização (Lanara, 1981).

Macronutrientes (Mg, Ca e K) e micronutriente (Fe) foram determinados por espectrometria de absorção atômica em chama – FAAS (Varian Spectra AA – 55), segundo metodologia descrita por AOAC (1995). Foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco de Ca, Mg, K e Fe, como fonte de radiação. Os elementos foram medidos em condições de operação otimizadas por FAAS em chama ar/acetileno ou óxido nitroso/acetileno. As leituras de Ca, Mg, K e Fe foram realizadas no FAAS, no modo absorção. Para eliminar possíveis interferências na determinação de Ca e Mg, foi adicionado cloreto de lantânio (Merck) nas amostras e nas soluções padrão na proporção de 1% (m/v). Os cálculos dos teores dos minerais nas amostras foram baseados em curvas de calibração obtidas com as soluções padrão.

3.3.3.4 Fermentação em Estado Sólido (FES)

O farelo, sem prévia classificação, foi utilizado nas fermentações conduzidas por 96 h em béqueres de polipropileno de 600 mL tampados com manta acrílica hidrofóbica (Figura 2), contendo 10 g de farelo seco com umidade ajustada com água destilada, conforme planejamento de experimentos. Após esterilização (121°C, 15 min) os béqueres foram inoculados e incubados em câmara climatizada (Tecnal TE-410). Para a

inoculação dos fungos, utilizou-se 2,5 mL de inóculo com concentração de esporos ajustada para se obter $1,5 \times 10^7$ esporos/g de farelo seco, incubando-se a 30°C.



Figura 2 – Béqueres de polipropileno utilizados para o processo fermentativo

3.3.3.5 Estudo da suplementação do farelo de mamona e torta de babaçu

Os suplementos testados foram o óleo de soja e melaço de cana de açúcar (ME, usina Ester, SP) e uréia. O resíduo de indústria como melaço (ME) pode ser considerado fonte suplementar complexa contendo, macro e micronutrientes. Fermentações em farelo de mamona e torta de babaçu puro foram sempre conduzidas paralelamente, considerando-se como meio controle (Rigo, 2009).

Para a realização das suplementações foram preparadas emulsões com água deionizada e a concentração do respectivo suplemento homogeneizando-se com mixer por 3 minutos, levando-se em consideração os níveis avaliados no planejamento de experimentos.

O volume de emulsão adicionado ao farelo foi padronizado em 2 mL. O ajuste de umidade foi realizado com água destilada estéril, levando-se em consideração a quantidade de água presente no inóculo e a umidade natural dos farelos brutos. As emulsões foram adicionadas por gotejamento manual com auxílio de pipetador, de forma que toda a área do farelo fosse recoberta, melhorando assim a homogeneidade do

meio. A umidade do meio foi ajustada conforme planejamento fatorial. Os béqueres foram então fechados com manta acrílica e autoclavados a 121°C por 15 min.

Após a esterilização, procedeu-se a inoculação do farelo com uma suspensão de esporos dos micro-organismos, padronizando-se a suspensão em $1,5 \times 10^7$ esporos/(g farelo seco). Os béqueres foram incubados em câmara a 30°C, com injeção de ar úmido, de forma a manter a umidade relativa do ar no interior da câmara maior que 90%.

A avaliação do comportamento cinético da suplementação do farelo na produção de lipase com atividade hidrolítica foi realizada por fermentações em triplicata de experimentos, com retirada de amostras destrutivas do material fermentado nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação na mesma câmara de incubação. A variável resposta foi a atividade hidrolítica e de esterificação determinada como descrito no item 3.3.5.

3.3.3.6 Estudo da produção de lipase

Inicialmente foram realizados testes para antever o comportamento das cepas *Penicillium verrucosum* e *Penicillium brevicompactum* perante os substratos utilizados (farelo de mamona e torta de babaçu). Para que as condições de produção de lipases pelos fungos fossem otimizadas, utilizou-se a técnica de planejamento fatorial de experimentos e análise de superfície de resposta.

A técnica de planejamento de experimentos é uma ferramenta estatística que permite determinar as variáveis que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo, assim como avaliar possíveis inter-relações entre variáveis de um processo. Além disso, essa ferramenta também permite otimizar o sistema em estudo, com o objetivo de maximizar ou minimizar uma resposta. A principal vantagem da utilização desta ferramenta é a redução do número de experimentos e a consequente redução de custos (Barros *et al.*, 1996).

Quatro planejamentos fatoriais fracionários 2^{4-1} com um ponto central repetido três vezes foram realizados avaliando-se a cinética de produção até 96 horas. As amostras foram analisadas em cinética até 96 horas. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para determinar a influência das variáveis estudadas e otimizar as condições de cultivo para a produção de lipases por fermentação em estado sólido.

As variáveis e níveis estudados nos planejamentos encontram-se na Tabela 7, sendo que os níveis avaliados foram determinados com base em ensaios preliminares e na experiência prévia do grupo.

Os planejamentos 1 e 3 avaliaram a produção de lipase por *P. brevicompactum* em torta de babaçu e farelo de mamona, respectivamente e para os planejamentos 2 e 4 avaliaram a produção de lipase por *P. verrucosum* em torta de babaçu e farelo de mamona. Convém salientar que a temperatura e concentração de esporos foram fixados em 30°C e $1,5 \times 10^7$ esporos/(g farelo seco), respectivamente.

Adotou-se as mesmas variáveis e níveis para produção de enzimas com atividade de esterificação e hidrolítica.

Tabela 7– Variáveis e níveis estudados nos planejamentos 1, 2, 3 e 4.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Melaço (%)	0	2	4
Uréia (%)	0	1	2
Óleo de soja (%)	0	1	2
Umidade (%)	55	65	75

Após o tratamento estatístico para conhecimento das variáveis que possuem efeito significativo na produção de lipase, partiu-se para a otimização desta produção através de 2 novos planejamentos experimentais completos 2^2 com 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, somente para a cepa de *Penicillium brevicompactum* com farelo de mamona e torta de babaçu, pois os resultados obtidos para a cepa de *Penicillium verrucosum* não foram satisfatórios.

Nestes novos planejamentos, o melaço e ureia foram retirados e deslocou-se os níveis estudados de óleo de soja e umidade. Os níveis e os referidos fatores (umidade e concentração do suplemento) que foram investigados nos planejamentos 5 e 6 são apresentados na Tabela 8. Sendo que o planejamento 5 foi realizado com torta de babaçu e o planejamento 6 com farelo de mamona, ambos com o micro-organismo *P. brevicompactum*.

Tabela 8 – Variáveis e níveis estudados nos planejamentos 5 e 6.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Óleo de soja (%)	0,6	1	2	3	3,4
Umidade (%)	56	60	70	80	84

3.3.4 Processo de extração da enzima

O processo de extração foi realizado em erlenmeyeres de 250 mL, onde ao meio fermentado era adicionado tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 na razão 1:5 (10 g de meio fermentado para 50 mL de tampão). Estes frascos foram incubados por 20 min a 35°C e 200 rpm em agitador orbital. Após a incubação, as amostras foram filtradas, utilizando-se tecido de nylon e pressão manual obtendo-se o extrato enzimático bruto (Vargas *et al.*, 2008).

A atividade enzimática foi determinada segundo procedimento descrito no item 3.3.5. Todas as determinações foram realizadas em duplicata. Cabe ressaltar que a determinação da atividade de esterificação deve ocorrer em sistema com baixo conteúdo de umidade. Assim, foi necessário realizar a desidratação do extrato aquoso obtido após o processo de extração da enzima da matriz sólida. Para tanto, foi empregado o processo de liofilização.

Os extratos foram dispostos em camadas de um centímetro de espessura em placas de Petri e então submetidos ao congelamento a -80°C por 24 h, como fase preparatória do procedimento de liofilização (Persson *et al.*, 2002). As amostras foram então levadas ao liofilizador, onde através do processo de sublimação em condições de vácuo, a água livre presente no congelado foi removida.

A umidade residual dos extratos liofilizados foi determinada em sistema Karl Fisher, sendo que o teor de água dos extratos enzimáticos não ultrapassou 12%. As amostras secas foram acondicionadas em frascos de vidro, lacrados, codificados e vedados com Parafilm, sendo armazenadas sob refrigeração (4°C).

3.3.5 Determinação de atividade enzimática

3.3.5.1 Determinação da atividade hidrolítica

Para a dosagem da atividade de hidrolítica dos extratos enzimáticos lipolíticos, utilizou-se uma emulsão de óleo de oliva 5% (m/v) e goma arábica 5 % (m/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. A 18 mL desta emulsão são adicionados 2 mL da amostra do extrato bruto aquoso. Após incubação por 20 minutos a 35°C com agitação de 200 rpm, a reação era interrompida através da adição de uma solução de acetona-etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados durante a reação eram então titulados até pH 11 com solução 0,05 M de NaOH em titulador automático. Os brancos reacionais foram preparados adicionando-se 18 mL da emulsão de óleo de oliva e goma arábica a solução de acetona-etanol e a amostra logo em seguida. Para a dosagem da atividade de hidrólise da enzima pré-purificada liofilizada, 0,1 g de amostra foram adicionadas ao meio reacional.

O cálculo da atividade hidrolítica foi realizado de acordo com a Equação 3. Uma unidade de atividade hidrolítica é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de ácido graxo por minuto nas condições de reação (Cavalcanti *et al.*, 2005).

$$AH = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 1000}{t \times V_c} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

AH = atividade hidrolítica (U/mL);

Va = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após a reação (mL);

Vb = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo zero- branco (mL);

M = molaridade da solução de NaOH (mmol/mL);

t = tempo de reação (min);

Vc = volume do extrato enzimático usado na reação (mL).

3.3.5.2 Determinação da atividade de esterificação

A atividade de esterificação do extrato enzimático bruto liofilizado foi quantificada através da reação de síntese do ácido oleico e etanol (razão molar 1:1) (Langone *et al.*, 2002; Bernardes *et al.*, 2007, modificado). A reação foi conduzida a 40°C, 160 rpm por 40 min. Esta foi iniciada pela adição do extrato liofilizado (0,1 g) ao meio reacional, em frascos de vidro com tampa mantidos em agitador orbital. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata no início e ao final da reação. A cada amostra foram adicionados 20 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para paralisar a reação e para extração do ácido oleico.

A quantidade de ácido consumida foi determinada por titulação com NaOH 0,035 M. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio. A atividade enzimática foi calculada utilizando a Equação 4.

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000 \times V_f}{t \cdot M_{EL} \times V_c} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

AE = atividade de esterificação (U/g);

V_a = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 min (mL);

V_b = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo 0 (mL);

M = molaridade da solução de NaOH;

V_f = volume final de meio reacional (mL);

t = tempo (min);

M_{EL} = massa da preparação enzimática liofilizada utilizada na reação (g);

V_c = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

3.3.5.3 Determinação de atividade proteásica

Em tubos de polipropileno de 1,5 mL foram adicionados 0,5 mL de amostra e 0,5 mL de solução de azocaseína 0,5% (m/v) preparada em tampão acetato 50 mM pH 5,0.

Os tubos foram então incubados durante 15 min (Vargas *et al.*, 2008) a 37°C. Após o período de incubação, a reação enzimática foi interrompida adicionando-se 0,5 mL de solução de ácido tricloro-acético (TCA) 10% (m/v), em banho de gelo. Os tubos com a mistura foram centrifugados a 12.900xg por 20 min. Retirava-se então 1 mL do sobrenadante, ao qual foi adicionado 1 mL de solução de hidróxido de potássio 5 M. Fazia-se então a determinação da absorbância da solução por espectrofotometria em 428 nm. O branco das reações era preparado adicionando-se a amostra após a adição do TCA. O branco do aparelho foi preparado substituindo-se o volume de amostra por tampão acetato 50 mM pH 5,0. Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença unitária de absorbância por minuto de reação entre o branco reacional e a amostra nas condições de ensaio, determinada através da Equação 5.

$$AP = \frac{(Abs_a \times f_a - Abs_b \times f_b)}{t \times V_a} \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

AP = atividade proteásica (U/mL);

Abs_a = leitura de absorbância da amostra;

Abs_b = leitura de absorbância do branco;

f = fator de diluição;

t = tempo de reação (min);

V_a = volume de amostra (mL).

3.3.6 Concentração da lipase

De acordo com metodologia desenvolvida por Menoncin *et al.* (2008), o ensaio de precipitação foi realizado com a adição de 150 mL do extrato enzimático bruto em um béquer de 500 mL, ao qual foi acrescentado sulfato de amônio (Vetec) até a concentração de 60% de condição de saturação. O béquer contendo a referida mistura foi mantido a 4°C em banho de gelo, com agitação constante, controlando-se o pH em 7,0 com adição de NaOH 20%.

O extrato enzimático acrescido do sal foi transferido para tubos de centrífuga e mantido a (-10°C) durante 5 h. Transcorrido este tempo, o mesmo foi centrifugado (4°C; 5400xg durante 30 minutos), possibilitando a separação da fração protéica. O sobrenadante era descartado e o precipitado removido com quantidade mínima de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 (Shu *et al.*, 2006, Menoncin *et al.*, 2008).

As amostras foram então congeladas a -80°C e liofilizadas por 48 horas. A atividade hidrolítica e de esterificação foram determinadas conforme item 3.3.5 e o teor de proteína foi realizado conforme item 3.3.7.

3.3.7 Determinação de proteína pelo método de Bradford (1976)

A determinação de proteínas foi realizada de acordo com método proposto por Bradford (1976), utilizando curva padrão de albumina de soro bovino. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm, após 2 min da adição de 0,1 mL de amostra a 5 mL do reagente de Bradford.

3.3.8 Imobilização das lipases

O extrato bruto e precipitado na condição maximizada foi imobilizado utilizando o princípio de adsorção. Neste sentido, dois suportes foram utilizados, Accurel EP 100 e em solução de Alginato de sódio com carvão ativado.

3.3.8.1 Imobilização em Accurel

Para a imobilização da enzima 1 g de suporte Accurel EP 100 foi embebido em 10 mL de etanol, sendo esta solução mantida por 30 minutos em contato sob agitação. Posteriormente, o etanol foi removido e o suporte lavado sucessivas vezes com água destilada. O objetivo deste procedimento foi o deslocamento do ar existente no interior do suporte para permitir o acesso de soluções contendo a enzima.

Preparou-se 60 mL de uma solução enzimática (60 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M e 3 g de enzima precipitada). Ao suporte previamente preparado adicionou-se 50 mL da solução enzimática, a qual foi mantida sob agitação magnética em temperatura de 5°C (banho de gelo) por 2 horas. O restante da solução foi utilizada para determinação de proteína e atividade de hidrólise inicial. Esta metodologia foi definida após ensaios preliminares nos quais verificou-se que para a imobilização do extrato enzimático era necessária uma atividade específica mínima para garantir a eficiência da adsorção.

Em tempos de 0, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 minutos foram retiradas alíquotas de 250 µL para posterior medida de proteína e construção de um gráfico do teor de proteína em função do tempo de reação. A medida de proteína foi feita pelo método de Bradford (1976).

Foram medidas também as atividades de hidrólise da solução de entrada e solução de saída, conforme metodologia descrita no item 3.3.5 e cálculo da retenção durante a imobilização através das Equações 6, 7 e 8.

Para a determinação da atividade de esterificação utilizou-se a enzima imobilizada.

$$\eta(\%) = \frac{P_s}{P_o} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

$$Ra(\%) = \frac{AR \times 100}{Ar} \quad \text{Equação 7}$$

$$Ar = Ae - As \quad \text{Equação 8}$$

onde:

η = Rendimento (%);

P_s = Quantidade de proteína adsorvida (diferença entre a inicial e a estável);

P_o = Quantidade de proteína utilizada na imobilização (solução de entrada);

R_a = Retenção (%);

A_R = Atividade Real (atividade da enzima imobilizada) (U);

A_r = Atividade Teórica (U) (Equação 9)

A_e = Atividade de entrada (U);

A_s = Atividade de saída (U).

Após o término do processo de adsorção, as amostras foram filtradas a vácuo e permaneceram por 48 horas em dessecador. Em seguida, foram medidas a atividade de hidrolítica e de esterificação das enzimas imobilizadas e o conteúdo de água das mesmas por aparelho Karl Fisher. Foi medida também a proteína da solução de entrada e de saída e da enzima imobilizada pelo método de Bradford.

3.3.8.2 Imobilização em Alginato de Sódio e Carvão Ativado

Após a obtenção da enzima e sua recuperação, preparou-se uma solução de gel e a solução com a enzima. Para o preparo da solução de gel adicionou-se 16,5 g de água destilada e 0,75 g de alginato de sódio, os quais foram aquecidos para a dissolução total do alginato. Em seguida, adicionou-se 12,5 g de sacarose.

Depois da dissolução do alginato de sódio e do resfriamento da solução de gel, adicionou-se a solução composta por 5 mL de solução enzimática com a atividade pré-estabelecida, 3,5 mL de glutaraldeído e 0,75 g de carvão ativado (Risso, 2004).

Para a formação das esferas, utilizou-se bomba peristáltica para fazer o bombeamento do gel sobre uma solução de cloreto de cálcio 0,2 M em tampão acetato 0,1 M a pH 4,8 com 3,5% de glutaraldeído a 10°C, sob agitação.

As enzimas imobilizadas foram deixadas em descanso na geladeira por 24 horas. A seguir, foram lavadas com água destilada, e a sua última lavagem foi realizada em tampão acetato. Em seguida, foram imersas em solução de cloreto de cálcio 0,05 M em

tampão acetato, com o objetivo de manter a estrutura das enzimas. A atividade de hidrólise e de esterificação foi determinada conforme item 3.3.5.

3.3.9 Caracterização parcial do extrato enzimático

3.3.9.1 Especificidade do extrato enzimático com atividade de esterificação

Para determinação da especificidade do extrato enzimático com atividade de esterificação, utilizou-se o extrato bruto e o extrato concentrado nas condições maximizadas e previamente liofilizado.

Os extratos enzimáticos, produzidos através de fermentação foram caracterizados frente a diferentes alcoóis e ácidos graxos.

- Alcoóis

A seletividade do extrato enzimático bruto e concentrado ambos liofilizados foram avaliadas em diferentes alcoóis (metanol, etanol, n-propanol e n-butanol) através da determinação da atividade de esterificação. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o procedimento padrão, descrito no item 3.3.5.

- Ácidos Graxos

A seletividade da enzima do extrato enzimático bruto e do extrato concentrado ambos liofilizados foram avaliadas em ácido láurico (12:0), oléico (18:0) e butírico (4:0) (Bradoo *et al.*, 2002). A atividade enzimática foi determinada de acordo com o procedimento padrão, descrito no item 3.3.5.

3.3.9.2 Especificidade do extrato enzimático com atividade hidrolítica

Os diferentes triglicerídeos a serem utilizados na avaliação da especificidade hidrolítica do extrato concentrado liofilizado e no extrato bruto liofilizado foram óleo de mamona, óleo de dendê, óleo de pinhão manso, óleo de côco, tributirina, óleo de oliva e

óleo de soja (Colen *et al.*, 2006; Bradoo *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 1995). Os ensaios foram realizados segundo metodologia descrita no item 3.3.5.

3.3.9.3 Estabilidade a baixas temperaturas

A determinação da estabilidade em função da temperatura foi realizada incubando-se o extrato bruto e concentrado ambos liofilizados, nas condições maximizadas, os extratos foram armazenados à temperaturas de 4°C e -10°C, sendo medida a atividade de hidrólise e de esterificação no tempo inicial (t=0) e à cada 10 dias, medida conforme item 3.3.5.

3.3.10 Alcoólise de óleo vegetal utilizando lipases como catalisadores

3.3.10.1 Substrato e solvente

O óleo de soja (Bunge) foi escolhido como substrato a ser utilizado na alcoólise enzimática em solvente orgânico. Álcool etílico (Merck, 99% de pureza), foi utilizado nos experimentos como substrato e solvente orgânico escolhido para a realização deste estudo foi n-hexano PA (Merck) (Faccio, 2004).

3.3.10.2 Procedimento experimental para reação

Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL fechados com tampa de vidro. As quantidades de óleo e solvente (n-hexano) foram mantidas fixas em 1g e 40 mL, respectivamente. Já as quantidades de lipase foram variadas de 500 µg a 1500 µg e de etanol foi fixada em 150 µg. O excesso de solvente foi definido visando garantir completa solubilização dos substratos e produtos. Os erlenmeyers foram, então, incubados em agitador rotativo (shaker) a 200 rpm por 8 horas. Depois de decorrido o tempo de reação, a amostra foi filtrada e levada à evaporação do solvente em estufa na

temperatura de 70°C, e então diluída em 10 mL de n-heptano. As amostras foram analisadas conforme metodologia descrita no item 3.3.10.3.

3.3.10.3 Determinação da conversão da reação

As amostras eram previamente preparadas (após evaporação do etanol não reagido), transferindo-se 250 µL da amostra para balão volumétrico de 10 mL completando o volume com n-heptano. Após, transferia-se uma alíquota desta solução para balão de 1 mL, a fim de obter uma concentração de 1000 mg/L e adicionava-se o padrão interno (metil heptadecanoato) na concentração de 250 mg/L, utilizando como solvente n-heptano.

A solução era então injetada (1 mL) em duplicata em um cromatógrafo gasoso nas condições cromatográficas conforme EN14103 (2001), possibilitando a determinação do percentual de ésteres etílicos nas amostras e conseqüentemente o valor da conversão da reação.

Em relação ao método cromatográfico utilizado para quantificação dos ésteres de ácidos graxos utilizou-se o apresentado pela EN14103 (2001).

3.3.11 Caracterização dos catalisadores

A análise textural dos catalisadores foi realizada a partir das isotermas de adsorção/dessorção de N₂. As medidas foram realizadas para a determinação das áreas superficiais, volume total de poros, volume de microporos e diâmetro médio de poros e distribuição de tamanhos de poros.

Foi empregado o equipamento AUTOSORB-1 da Quantachrome (Nova- 2200e). Antes da análise, as amostras foram tratadas a vácuo, a uma temperatura de 100°C para garantir a secagem completa. As medidas foram realizadas na temperatura do N₂ líquido (-196°C). Os parâmetros texturais foram determinados a partir das isotermas obtidas. A área superficial específica foi determinada pelo método BET e o diâmetro médio dos poros foi calculado utilizando o método BJH (Barret, Joynere, Halenda).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO

Na produção de enzimas, as tortas e farelos são usados como substratos para FES ou como suplemento do meio de produção, em termos de fonte de carbono e nitrogênio (Ramachandran *et al.*, 2007).

A Tabela 9 apresenta os resultados da caracterização da torta de babaçu e do farelo de mamona utilizados neste trabalho. Em uma análise preliminar, pode-se considerar que ambos os substratos são ricos em nutrientes, constituindo um meio adequado à fermentação. Valores próximos foram obtidos por Palma *et al.* (2000) para caracterização da torta de babaçu.

Ao se comparar os dois substratos analisados, ambos possuem valores semelhantes no conteúdo de cinzas, umidade, proteína e nitrogênio, somente se diferenciando nos valores de lipídios, evidenciando que o farelo de mamona possui maior concentração de carbono e necessitaria menos suplementação que a torta de babaçu.

É interessante notar que valor maior para o teor de nitrogênio foi obtido por Vargas (2004) ao caracterizar farelo de soja, em torno de 6,8%. Cordova *et al.* (1998) obtiveram valores semelhantes ao do farelo de mamona em termos de lipídios.

Mahadik *et al.* (2002) evidenciaram que a produção de lipases somente ocorre em meio que possui uma quantidade significativa de lipídios. Vários resíduos agroindustriais como bagaço de mandioca, casca de café, polpa de maçã e resíduos de feijão, de soja e de batata podem ser utilizados em FES para produção de lipases a partir de diferentes micro-organismos (Soccol e Vandenberghe, 2003).

A produção de cepas de *Rhizopus* sp. é favorecida quando o substrato usado para a bioconversão é o bagaço de mandioca devido aos seus baixos valores de minerais e cinzas (Pandey e Soccol, 2000). A presença de íons cálcio e sódio no meio favoreceram o aumento da atividade enzimática (Germano *et al.*, 1998; Germano *et al.*, 2003).

Tabela 9 – Caracterização química dos substratos utilizados para produção de lipase por FES.

	Cinzas (%)	Umidade (%)	Proteína (%)	Nitrogênio (%)	Lipídeos (%)	Minerais (mg/100g)				
						Fe	K	Ca	Al	Mg
Torta de babaçu	0,041 ±0,002	4,16±0,2	26,38 ±0,21	4,22 ±0,035	7,56 ±0,13	18,09 ±0,80	470,47 ±0,5	65,75 ±1,69	2,42 ±0,78	36,27 ±0,77
Farelo mamona	0,057 ±0,009	5,76 ±0,09	25,59 ±1,07	4,09± 0,17	14,34 ±0,19	17,23 ±0,44	884,41 ±0,57	24,31 ±3,55	1,06 ±0,04	38,64 ±2,29

Ainda assim, neste trabalho optou-se por se realizar um estudo de suplementação ao farelo de mamona e à torta de babaçu, com componentes de baixo custo, a fim de verificar as necessidades nutricionais dos micro-organismos para maximizar a produção de lipase. A literatura relata que a suplementação do meio com lipídios em alguns casos não é eficiente. Ao adicionar outras fontes de carbono complementar, ocorria a redução da produção, o que foi atribuído à repressão catabólica pela fonte de carbono disponível no meio de cultura (Kamini *et al.*, 1998).

4.2 MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Penicillium verrucosum* EM TORTA DE BABAÇU E FARELO DE MAMONA

Com os resultados obtidos em ensaios preliminares (Anexo 1 e 2), observou-se necessária a utilização de fontes suplementares de nutrientes na torta de babaçu e no farelo de mamona. Assim, aplicou-se um planejamento de experimentos tendo como finalidade avaliar o efeito da suplementação na produção de lipase por fermentação em estado sólido, maximizando a produção da enzima em função da suplementação. Este planejamento consistiu em um fatorial fracionário 2^{4-1} , para avaliar os efeitos principais das variáveis. As faixas de estudo foram ajustadas em função dos testes preliminares. Nestes experimentos, as amostras foram coletadas no tempo 0 e a cada 24 h até 96 h de fermentação. O objetivo deste acompanhamento cinético foi identificar a fase de máxima produção de lipase. As Tabelas 10 e 11 apresentam os resultados para o planejamento fatorial (2 e 4) da fermentação com torta de babaçu e farelo de mamona com a cepa de *P. verrucosum*, respectivamente.

Tabela 10 - Matriz do planejamento experimental (2) (valores reais e codificados) com as respostas da atividade hidrolítica para FES com *P.verrucosum* utilizando como meio torta de babaçu.

Ensaio	Umidade (%)	Melaço (%)	Ureia (%)	Óleo de soja (%)	Atividade Hidrolítica U/g				
					Tempo (h)				
					0	24	48	72	96
1	55 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,00	0,00	32,69	26,87	21,21
2	75 (1)	0 (-1)	0 (-1)	2 (1)	0,00	0,00	27,50	0,00	0,00
3	55 (-1)	4 (1)	0 (-1)	2 (1)	0,00	0,00	27,19	8,08	5,39
4	75 (1)	4 (1)	0 (-1)	0 (-1)	6,81	0,00	0,00	0,00	0,00
5	55 (-1)	0 (-1)	2 (1)	2 (1)	0,00	0,00	17,15	16,41	0,00
6	75 (1)	0 (-1)	2 (1)	0 (-1)	0,00	0,00	0,00	15,79	0,00
7	55 (-1)	4 (1)	2 (1)	0 (-1)	0,00	5,03	4,67	8,48	13,35
8	75 (1)	4 (1)	2 (1)	2 (1)	0,00	7,78	9,82	18,92	27,40
9	65 (0)	2 (0)	1 (0)	1 (0)	0,26	0,86	0,02	17,86	17,37
10	65 (0)	2 (0)	1 (0)	1 (0)	0,00	0,00	0,00	15,86	15,41
11	65 (0)	2 (0)	1 (0)	1 (0)	0,00	0,00	0,00	19,53	16,00

Na Tabela 10 pode-se observar que a atividade hidrolítica máxima obtida nos tempos analisados ocorreu no experimento 1, condição sem suplementos, no qual uma atividade de 32,69U/g de farelo seco em 48 horas de fermentação.

A diminuição da atividade enzimática também foi observada na produção de tanase por *Aspergillus niger* em FES, quando o substrato foi suplementado com glicose, acarretando assim um aumento de carbono no meio e prejudicando a atividade catabólica (Aguilar *et al.*, 2001).

Tabela 11- Matriz do planejamento experimental (4) (valores reais e codificados) com as respostas da atividade hidrolítica para FES com *P.verrucosum* utilizando como meio farelo de mamona.

Ensaio	Umidade (%)	Melaço (%)	Ureia (%)	Óleo de soja (%)	Atividade hidrolítica U/g				
					Tempo (h)				
					0	24	48	72	96
1	55 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,00	0,00	8,99	15,88	6,85
2	75 (1)	0 (-1)	0 (-1)	2 (1)	0,00	6,06	7,65	6,40	7,56
3	55 (-1)	4 (1)	0 (-1)	2 (1)	1,10	6,50	13,87	0,00	0,00
4	75 (1)	4 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	55 (-1)	0 (-1)	2 (1)	2 (1)	0,00	0,00	0,56	0,00	0,00
6	75 (1)	0 (-1)	2 (1)	0 (-1)	0,00	0,00	0,00	6,68	0,00
7	55 (-1)	4 (1)	2 (1)	0 (-1)	0,00	0,00	0,00	7,18	3,27
8	75 (1)	4 (1)	2 (1)	2 (1)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	65 (0)	2 (0)	1 (0)	1 (0)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	65 (0)	2 (0)	1 (0)	1 (0)	0,00	0,37	0,37	0,00	0,00
11	65 (0)	2 (0)	1 (0)	1 (0)	0,00	0,00	0,00	0,51	0,00

Na Tabela 11 pode-se observar que a atividade hidrolítica máxima obtida nos tempos analisados ocorreu no ensaio 1 em 72h (U=55%). Ao contrário deste trabalho, Papaparaskevas *et al.* (1992), para produção de uma lipase extracelular de *Rhodoturula glutinis*, compararam duas fontes de carbono (óleo de palma e frutose), constatando que a presença de lipídio como fonte carbono aumentava em 12 vezes a produção enzimática do que a frutose.

A capacidade de micro-organismos produtores de lipase utilizar lipídios e açúcares como fonte de carbono fica evidenciado no trabalho de Lotti *et al.* (1998) que utilizaram *Candida rugosa* e para Sharon *et al.* (1998) que utilizaram *P.aeruginosa* KKK-5 e meio suplementado com 2% de óleo de rícino atingindo uma máxima atividade 32,9 U/g e 23,45 U/g, respectivamente.

Cabe ressaltar que a produção de lipase por FS que contém mais de 1,5% de óleo como fonte carbono pode ser afetada pelo excesso do mesmo (Rodriguez *et al.*, 2006). Ainda Lima *et al.* (2003) sugerem que a atividade enzimática decresce devido à dificuldade na transferência de oxigênio durante o processo fermentativo.

Como as maiores atividades enzimáticas foram obtidas nos experimentos sem suplementação e estas são relativamente baixas em comparação a atividade de hidrólise, optou-se por interromper o estudo da produção de lipase utilizando o *P. verrucosum* neste trabalho.

4.3 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Penicillium brevicompactum* EM TORTA DE BABAÇU E FARELO DE MAMONA

4.3.1 Maximização da produção da lipase hidrolítica

Com os resultados obtidos em ensaios preliminares (Anexo 1 e 2), observou-se necessária a utilização de fontes suplementares de nutrientes na torta de babaçu. Assim, aplicou-se 2 planejamentos de experimentos, tendo como finalidade avaliar o efeito da suplementação na produção de lipase por fermentação em estado sólido, maximizando a produção da enzima em função da suplementação. Este planejamento também consistiu em um fatorial fracionário 2^{4-1} , para avaliar o efeito principal das variáveis. As faixas de estudo foram ajustadas em função dos testes preliminares. Nestes experimentos, as amostras foram coletadas no tempo 0 e a cada 24 h até o término da fermentação (96 h). As Tabelas 12 e 13 apresentam os resultados para o planejamento fatorial (1 e 3), da fermentação com torta de babaçu e farelo de mamona com a cepa de *P.brevicompactum*, respectivamente.

Na Tabela 12 pode-se observar que a atividade hidrolítica máxima obtida nos tempos analisados ocorreu no ponto central (U=65%) em 96 h. Cabe ressaltar que a segunda maior atividade lipásica também foi obtida no ponto central com 72 h, ambos os experimentos contendo suplementação. Segundo a caracterização do meio utilizado, esse pico de atividade pode ter ocorrido, devido as quantidades de nitrogênio (uréia) e carbono (óleo de soja e melão).

Tabela 12 - Matriz do planejamento experimental (1) (valores reais e codificados) com as respostas da atividade hidrolítica para FES com *P. brevicompactum* utilizando como meio torta de babaçu.

Ensaio	Umidade (%)	Melaço (%)	Uréia (%)	Óleo de soja (%)	Atividade Hidrolítica (U/g)				
					Tempo (h)				
					0	24	48	72	96
1	55 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,00	53,15	23,36	29,47	46,47
2	75 (1)	0 (-1)	0 (-1)	2 (1)	0,00	12,07	67,11	43,08	80,86
3	55 (-1)	4 (1)	0 (-1)	2 (1)	0,00	6,73	60,84	34,00	21,24
4	75 (1)	4 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0,00	12,66	38,68	0,00	0,00
5	55 (-1)	0 (-1)	2 (1)	2 (1)	0,00	0,00	15,54	18,20	53,36
6	75 (1)	0 (-1)	2 (1)	0 (-1)	0,00	0,00	0,00	31,91	0,00
7	55 (-1)	4 (1)	2 (1)	0 (-1)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	75 (1)	4 (1)	2 (1)	2 (1)	3,64	14,84	25,77	27,15	35,31
9	65 (0)	2 (0)	1 (0)	1 (0)	0,00	28,40	25,72	81,00	95,21
10	65 (0)	2 (0)	1 (0)	1 (0)	0,00	22,08	22,08	81,99	91,64
11	65 (0)	2 (0)	1 (0)	1 (0)	0,00	19,81	23,90	80,00	98,78

A análise estatística dos resultados de atividade hidrolítica permitiu a obtenção dos efeitos das variáveis estudadas. Os efeitos foram expressos na forma de gráficos de Pareto, apresentados na Figura 3. É interessante observar que o comportamento em 72 h é distinto do comportamento em 96 h. Em 72 h a umidade apresenta efeito positivo ($p < 0,05$) assim como a suplementação do meio com óleo de soja enquanto que a suplementação do meio com uréia e melaço apresenta efeito negativo ($p < 0,05$). Para 96 h de fermentação, somente a suplementação com óleo de soja apresentou efeito positivo. Os valores de atividade hidrolítica podem ser considerados promissores se comparados aos obtidos pelo fungo *Penicillium simplicissimum* 21,00 U/g em farelo de soja (Di Luccio *et al.*, 2004) e 30,00 U/g em torta de babaçu (Gutarra *et al.*, 2007).

Alguns estudos também mostram as vantagens na suplementação de meios. O bagaço de cana suplementado com óleo de oliva resultou em eficiente produção de lipase por *Rhizopus rhizopodiformis* e *Rhizomucor pusillus*, obtendo-se atividades de 79,60 U/g e 20,24 U/g com o uso de suplementos adequados (Cordova *et al.*, 1998).

4 Resultados e Discussões

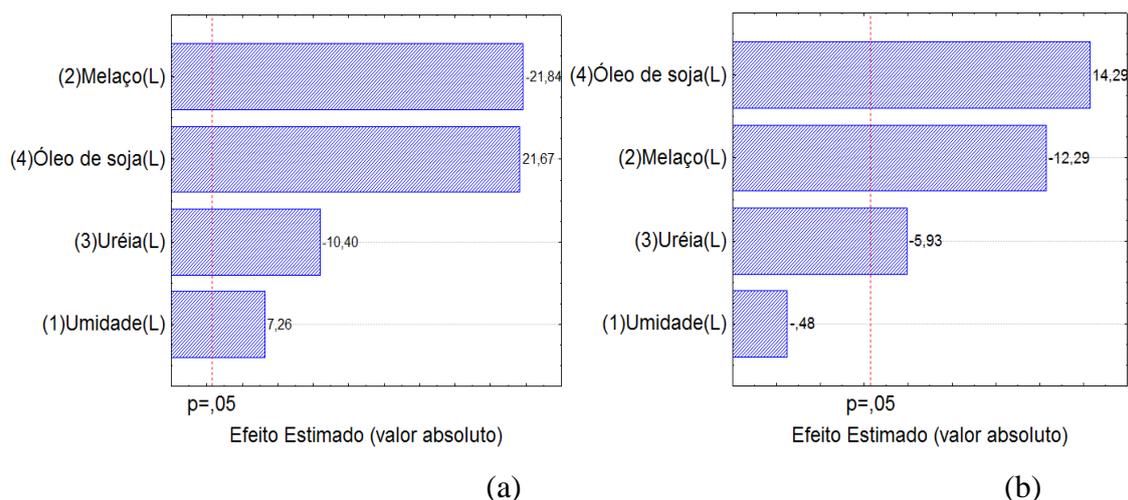


Figura 3 - Efeitos das variáveis manipuladas sobre a atividade hidrolítica *P. brevicompactum* em torta de babaçu, (a) análise em 72 horas e (b) análise em 96 horas.

Tabela 13 – Matriz do planejamento experimental (3) (valores reais e codificados) com as respostas da atividade hidrolítica para FES com *P. brevicompactum* utilizando como meio farelo de mamona.

Ensaio	Umidade (%)	Melaço (%)	Uréia (%)	Óleo de soja (%)	Atividade Hidrolítica (U/g)				
					Tempo (h)				
					0	24	48	72	96
1	55 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,00	0,00	44,17	52,09	36,72
2	75 (1)	0 (-1)	0 (-1)	2 (1)	0,00	17,36	78,62	57,08	78,37
3	55 (-1)	4 (1)	0 (-1)	2 (1)	0,00	2,93	39,32	25,63	5,26
4	75 (1)	4 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0,00	0,00	79,14	0,00	0,00
5	55 (-1)	0 (-1)	2 (1)	2 (1)	0,00	0,00	16,51	56,36	15,45
6	75 (1)	0 (-1)	2 (1)	0 (-1)	0,00	0,00	4,61	0,00	0,00
7	55 (-1)	4 (1)	2 (1)	0 (-1)	7,32	8,95	3,64	12,58	24,83
8	75 (1)	4 (1)	2 (1)	2 (1)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	65 (0)	2 (0)	1 (0)	1 (0)	0,00	0,00	10,10	54,67	49,30
10	65 (0)	2 (0)	1 (0)	1 (0)	0,00	2,21	8,21	45,80	53,24
11	65 (0)	2 (0)	1 (0)	1 (0)	0,00	0,00	9,00	50,24	51,26

Na Tabela 13 pode-se observar que a atividade hidrolítica máxima obtida nos tempos analisados ocorreu no ensaio 4 em 48 h (U=75%) sendo o meio suplementado com 4% de melão (carbono). Convém salientar que a segunda maior atividade lipásica foi obtida no ensaio 2 em 48 horas. No ensaio 2 a atividade pode ter sido menor pela falta de carbono, segundo a caracterização do farelo, já no ensaio 3 pelo excesso. Quando ocorre adição de nitrogênio (uréia) a atividade enzimática decresce, indicando que o farelo utilizado como meio já possui a quantidade necessária de nitrogênio para o crescimento do micro-organismo.

Na produção de lipase em fermentação submersa suplementada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ocorreu aumento de três vezes a atividade da lipase produzida por *Candida* sp. (Tan *et al.*, 2003). Rodriguez *et al.* (2006) observaram que a suplementação do bagaço de cana de açúcar com uréia possibilitou o aumento de seis vezes da atividade enzimática quando comparada, por exemplo, ao uso do extrato de levedura.

O aumento da concentração de fontes de nitrogênio nos meios pode contribuir para a produção de lipases microbianas, conforme demonstrado na produção de lipase em torta de *Jatropha curcas* (pinhão manso) por *Pseudomonas aeruginosa* suplementada com NaNO_3 (Mahanta *et al.*, 2008).

Estudos de FES para produção de lipases reportados na literatura apresentam o uso de fungos filamentosos e leveduras, sendo citados *Penicillium candidum*, *Mucor miehei*, *Penicillium camembertii*, *Monascus fuliginosus*, *Rhizomucor pusillus* e *Rhizomucor rhizopodiformis* utilizando bagaço de cana (Cordova *et al.*, 1998), *Aspergillus niger* utilizando torta de gergelim (Kamini *et al.*, 1998); *Penicillium restrictum* utilizando torta de babaçu (Palma *et al.*, 2000), *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja (Di Luccio *et al.*, 2004) e *Aspergillus oryzae* utilizando torta de óleo de côco (Ramachandran *et al.*, 2004) e *Penicillium* sp. (Wolski *et al.*, 2009b) para produção de lipase.

A análise estatística dos resultados de atividade hidrolítica apresentados na Tabela 13 permitiu a obtenção dos efeitos das variáveis estudadas. Os efeitos foram expressos na forma de gráficos de Pareto, apresentados na Figura 4. É interessante observar que o comportamento em 72 h é semelhante ao do comportamento em 96 h. Em ambos os casos somente a adição de óleo de soja, apresenta efeito positivo as demais variáveis estudadas efeito negativo.

Como conclusão parcial pode-se considerar que a utilização de suplementações como fonte de nitrogênio (uréia) e fonte de carbono (melaço), com o objetivo de aumentar o teor nutricional da torta de babaçu e do farelo de mamona se fez desnecessária nos planejamentos anteriores, sendo que estas em sua maioria causaram inibição da produção de lipase, apresentando efeitos negativos ou ainda estatisticamente não significativos. Portanto, pode-se considerar ambos os substratos ricos em fonte de nitrogênio dispensando a suplementação com fontes externas de nitrogênio.

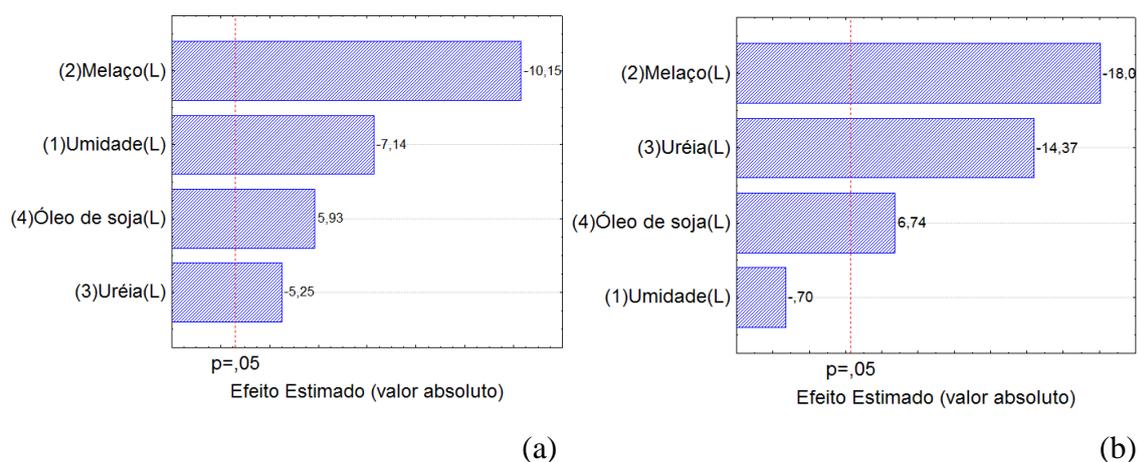


Figura 4 - Efeitos das variáveis manipuladas sobre a atividade hidrolítica *P. brevicompactum* em farelo de mamona, (a) análise 72 horas e (b) análise em 96 horas.

Com os resultados obtidos nos dois planejamentos anteriores, observou-se desnecessária a utilização de fontes suplementares de nutrientes nos substratos. Assim, desenvolveu-se dois novos planejamentos de experimentos tendo como finalidade avaliar o efeito da umidade e do óleo de soja, maximizando a produção da enzima em função das condições operacionais. As faixas de estudo foram ajustadas em função dos resultados obtidos nos planejamentos anteriores. Nestes experimentos, além das amostras de 72 horas de fermentação, foram coletadas amostras no tempo 96 horas, uma vez que durante avaliação preliminar observou-se que o máximo de produção encontrava-se nestes pontos. As Tabelas 14 e 15 apresentam os resultados para os novos planejamentos fatoriais para *Penicillium brevicompactum* com torta de babaçu e farelo de mamona, respectivamente.

Na Tabela 14 pode-se observar que a atividade hidrolítica máxima obtida nos dois tempos analisados ocorreu no ponto central (U=70%/OS=2%), seguido pela condição experimental 8 para 72 horas (U=70%/OS=3,4% e pela condição experimental 4 em 96 horas (U=80%/OS=3%). O mínimo obtido nos dois tempos foi encontrado na condição experimental 6 (U=84%/OS=2%). Nota-se que o micro-organismo tende a secretar maiores quantidades de enzima nos níveis superiores de umidade e intermediários de carbono (óleo de soja), conforme observado nos resultados anteriores.

Tabela 14 – Matriz do planejamento (5) experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas da atividade hidrolítica com *P. brevicompactum* e torta de babaçu em 72 h e 96 h.

Ensaio	Umidade (%)	Óleo de soja (%)	Atividade Hidrolítica (U/g)	
			Tempo (h)	
			72	96
1	60 (-1)	1 (-1)	13,85	26,90
2	80 (1)	1 (-1)	25,83	30,24
3	60 (-1)	3 (1)	13,28	0,00
4	80 (1)	3 (1)	28,30	33,44
5	56 (-1,41)	2 (0)	0,00	0,72
6	84 (1,41)	2 (0)	0,00	0,00
7	70 (0)	0,6 (-1,41)	31,82	27,72
8	70 (0)	3,4 (1,41)	35,14	26,99
9	70 (0)	2 (0)	42,17	45,23
10	70 (0)	2 (0)	48,05	48,37
11	70 (0)	2 (0)	45,01	48,60

Fato semelhante foi observado por Liu *et al.* (2006), que ao utilizar óleo de oliva como indutor para produção de lipase por *Burkholderia* sp. C20, verificaram que este último forneceu fonte de carbono extra para as células. Segundo Jaeger *et al.* (1994), a presença de óleos durante a reação de hidrólise pode promover uma capa de proteção para lipase quanto a oscilações de temperatura e a possíveis reações de proteólise.

He e Tan (2006) obtiveram máxima produção de lipase de *Candida* sp. 99-125 com o meio contendo óleo de soja (4,187%) atingindo uma atividade de 6230 U/mL.

Tabela 15 - Matriz do planejamento (6) experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas da atividade hidrolítica com *P. brevicompactum* e farelo de mamona em 72h e 96h.

Ensaio	Umidade (%)	Óleo de soja (%)	Atividade Hidrolítica (U/g)	
			Tempo (h)	
			72	96
1	60 (-1)	1 (-1)	13,14	47,23
2	80 (1)	1 (-1)	18,62	45,58
3	60 (-1)	3 (1)	9,76	30,82
4	80 (1)	3 (1)	0,00	35,48
5	56 (-1,41)	2 (0)	11,55	37,18
6	84 (1,41)	2 (0)	11,72	35,43
7	70 (0)	0,6 (-1,41)	0,00	0,00
8	70 (0)	3,4 (1,41)	0,00	26,43
9	70 (0)	2 (0)	42,00	83,80
10	70 (0)	2 (0)	41,14	87,60
11	70 (0)	2 (0)	43,53	91,40

Na Tabela 15 pode-se observar que a atividade hidrolítica máxima obtida nos dois tempos analisados ocorreu no ponto central (U=70%/OS=2%), seguido pela condição experimental 2 para 72 horas (U=80%/OS=1%) e pela condição experimental 1 em 96 horas (U=60%/OS=1%). O mínimo obtido nos dois tempos foi encontrado na condição experimental 7 (U=70%/OS=0,6%). Nota-se que o micro-organismo tende a secretar maiores quantidades de lipase em níveis superiores de umidade e intermediários de carbono (óleo de soja), conforme observado nos resultados anteriores.

Como observado também por Rodriguez *et al.* (2006), que pesquisaram diferentes óleos como fonte de carbono para o crescimento do *Rhizopus homothallicus*, quando o óleo é adicionado ao meio, o crescimento do micro-organismo é acelerado. Segundo Marek e Bednarski (1996), a presença de triglicerídeos ou ácidos graxos de cadeia curta no meio pode aumentar a secreção de enzimas lipolíticas pelo micro-organismo.

Com a análise estatística dos dados apresentados nas Tabelas 14 e 15, foi possível a validação de modelos empíricos para a atividade hidrolítica em função da quantidade de óleo de soja e umidade para cada tempo de fermentação analisado.

4 Resultados e Discussões

Os modelos codificados otimizados para 72 e 96 horas, respectivamente, são mostrados nas Equações 9 e 10, sendo que ambos foram validados pela análise de variância (ANOVA), apresentadas nas Tabelas 16 e 17. Observa-se que os coeficientes de determinação obtidos (0,95 e 0,93, respectivamente) e o F calculado (3,98 vezes maior que o F_{tab} para as atividades em 72 horas e 1,98 vezes para 96 horas) permitiram a validação do modelo com 95% de confiança. Com os modelos validados foi possível construir as superfícies de resposta juntamente com as curvas de contorno apresentadas nas Figuras 5 e 6.

$$\mathbf{AH72} = 45,06 + 3,38*U - 21,72*U^2 + 0,82*OS - 4,88*OS^2 + 0,75*OS*U$$

Equação 9

ONDE:

AH: Atividade Hidrolítica em 72 horas de fermentação (U/g farelo seco);

U: Umidade ;

OS :óleo de soja .

Tabela 16 – Análise de variância para atividade hidrolítica no tempo 72 horas, utilizando *P. brevicompactum* e torta de babaçu.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Fcalculado
Regressão	2755,37	5	551,07	20,10
Resíduo	137,07	5	27,41	
Falta de ajuste	119,76	3		
Erro puro	17,31	2		
Total	2892,49	10		

$F_{\text{tab},5,5,95\%} = 5,05$

$R^2 = 0,95$

$$\mathbf{AH96} = 47,35 + 13,98*U - 40,23*U^2 - 6,20*OS - 13,08*OS^2 + 15,05*OS*U$$

Equação 10

ONDE:

AH: Atividade Hidrolítica em 96 horas de fermentação (U/g farelo seco);

U: Umidade ;

OS :óleo de soja .

Tabela 17- Análise de variância para atividade hidrolítica no tempo 96 horas, utilizando *P. brevicompactum* e torta de babaçu.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Fcalculado
Regressão	3039,85	5	607,97	7,41
Resíduo	409,85	5	81,97	
Falta de ajuste	402,78	3		
Erro puro	7,07	2		
Total	3449,71	10		

$F_{\text{tab},5,5,95\%} = 5,05$ $R^2 = 0,93$

As superfícies de resposta (Figura 5a e 5b) mostram que em ambos os casos o máximo de atividade hidrolítica se encontra em torno do ponto central, o que determina a otimização da produção da enzima nas faixas estudadas (U=70% e OS= 2%), o que pode ser melhor visualizado nas curvas de contorno (Figura 6a e 6b). A atividade máxima obtida pode alcançar 45,07 U/g de farelo seco para 72 horas de fermentação e 47,40 U/g de farelo seco para 96 horas de fermentação. Através desta análise fica evidente que extremos de temperatura e umidade tendem a reduzir a produção de lipase, uma vez que em baixas concentrações de carbono a cepa não se desenvolve e em altas concentrações tem seu crescimento inibido por excesso de substrato. A umidade em níveis muito baixos prejudica o transporte de nutrientes e toxinas através da membrana e pode causar a perda das propriedades funcionais de enzimas da cadeia metabólica celular (Gervais e Molin, 2003). O excesso de umidade reduz a porosidade do substrato prejudicando a transferência de calor e oxigênio (Pandey, 2003).

Em relação ao planejamento 6, onde se utilizou como substrato farelo de mamona, a análise estatística mostra que em 72 horas o óleo de soja e a interação entre as variáveis óleo de soja e umidade possuem efeito significativo negativo ($p < 0,05$) na produção de lipase hidrolítica.

Mais uma vez, a análise estatística dos resultados permitiu a obtenção dos modelos codificados em função da quantidade de óleo de soja e umidade da matriz sólida, apresentados nas Equações 11 e 12. Estes foram validados pela análise de variância mostrada nas Tabelas 18 e 19. Os valores dos coeficientes de correlação (0,96 e 0,93, respectivamente) e os valores de F calculado (4,98 e 1,41 vezes maior que o

tabelado) validaram os modelos. Com os modelos codificados foi possível se obter as superfícies de respostas e curvas de contorno, apresentadas nas Figuras 7 e 8.

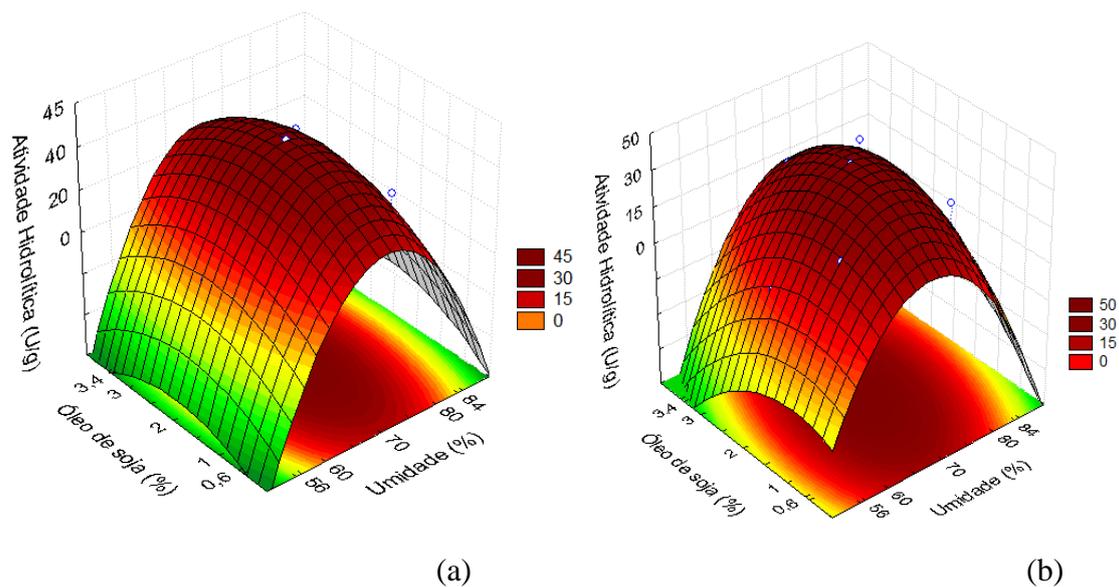


Figura 5 – Superfície de respostas para atividade hidrolítica (a) 72 horas de fermentação e (b) 96 horas de fermentação ambas utilizando *P. brevicompactum* e torta de babaçu.

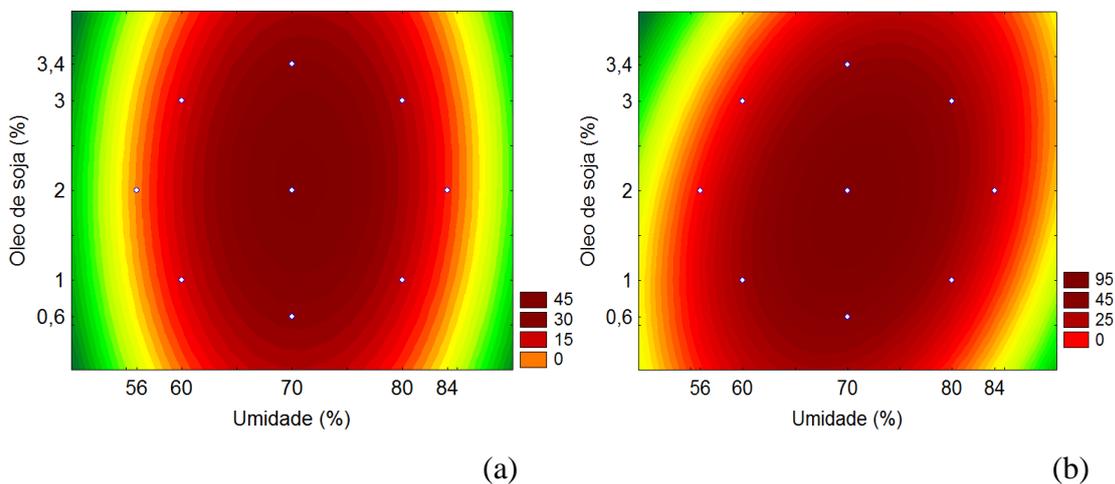


Figura 6 – Curvas de contorno para atividade hidrolítica (a) 72 horas de fermentação e (b) 96 horas de fermentação ambas utilizando *P. brevicompactum* e torta de babaçu.

$$\text{AH72} = 42,20 - 0,51*U - 14,17*U^2 - 2,76*OS - 20,03*OS^2 - 3,81*OS*U$$

Equação 11

ONDE:

AH: Atividade Hidrolítica em 72 horas de fermentação (U/g farelo seco);

U: Umidade ;

OS :óleo de soja .

Tabela 18 - Análise de variância para atividade hidrolítica no tempo 72 horas, utilizando *P. brevicompactum* e farelo de mamona.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Fcalculado
Regressão	2798,33	5	558,67	25,13
Resíduo	111,14	5	22,23	
Falta de ajuste	108,21	3		
Erro puro	2,94	2		
Total	2904,47	10		

F_{tab}: 5,5,95% = 5,05R² = 0,96

$$\text{AH96} = 87,54 + 0,07*U - 21,90*U^2 + 1,35*OS - 33,51*OS^2 + 1,57*OS*U$$

Equação 12

ONDE:

AH: Atividade Hidrolítica em 96 horas de fermentação (U/g farelo seco);

U: Umidade ;

OS :óleo de soja .

Tabela 19 - Análise de variância para atividade hidrolítica no tempo 96 horas, utilizando *P. brevicompactum* e farelo de mamona.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Fcalculado
Regressão	7216,89	5	1443,38	7,12
Resíduo	1014,17	5	202,83	
Falta de ajuste	985,33	3		
Erro puro	28,84	2		
Total	8231,05	10		

F_{tab}: 5,5,95% = 5,05R² = 0,93

As superfícies de resposta (Figuras 7a e 7b) mostram que em ambos os casos o máximo de atividade hidrolítica se encontra em torno do ponto central o que determina a otimização da produção da enzima nas faixas estudadas (U=70% e OS= 2%), o que pode ser melhor visualizado nas curvas de contorno (Figuras 8a e 8b). A atividade máxima obtida pode alcançar 42,22 U/g de farelo seco para 72 horas de fermentação e 87,6 U/g de farelo seco para 96 horas de fermentação.

O impacto do conteúdo de umidade na matriz sólida é definido através das diferenças dos produtos formados na fermentação, pois este afeta a homogeneidade de crescimento da cultura (Chinn *et al.*, 2008). O alto conteúdo de umidade inicial na matriz sólida da fermentação mostra-se necessário, uma vez que desde o momento do inóculo até o final da fermentação, este diminuirá devido à evaporação acarretada pelo calor metabólico, ressaltando a necessidade de um balanceamento do conteúdo de água no substrato suporte da FES (Chinn *et al.*, 2008; Suryanarayan, 2003). No entanto, pode ocasionar a diminuição da porosidade do substrato limitando os processos de transferência de calor e massa (Gutarra *et al.*, 2005; Pandey, 2003; Mitchell *et al.*, 2003; Mahadik *et al.*, 2002).

Portanto, para aumentar o desempenho da FES, alguns fatores devem ser ajustados de acordo com a especificidade do micro-organismo e o substrato usado, facilitando a formação do micélio contribuindo para secreção da enzima hidrolítica (Couto e Sanromán, 2005; Rahardjo *et al.*, 2005; Raghavarao *et al.*, 2003). Deve-se considerar ainda que a porosidade do leito da fermentação em estado sólido e a área superficial estão diretamente relacionadas com a taxa de oxigênio distribuído e o espaço entre as partículas de substrato.

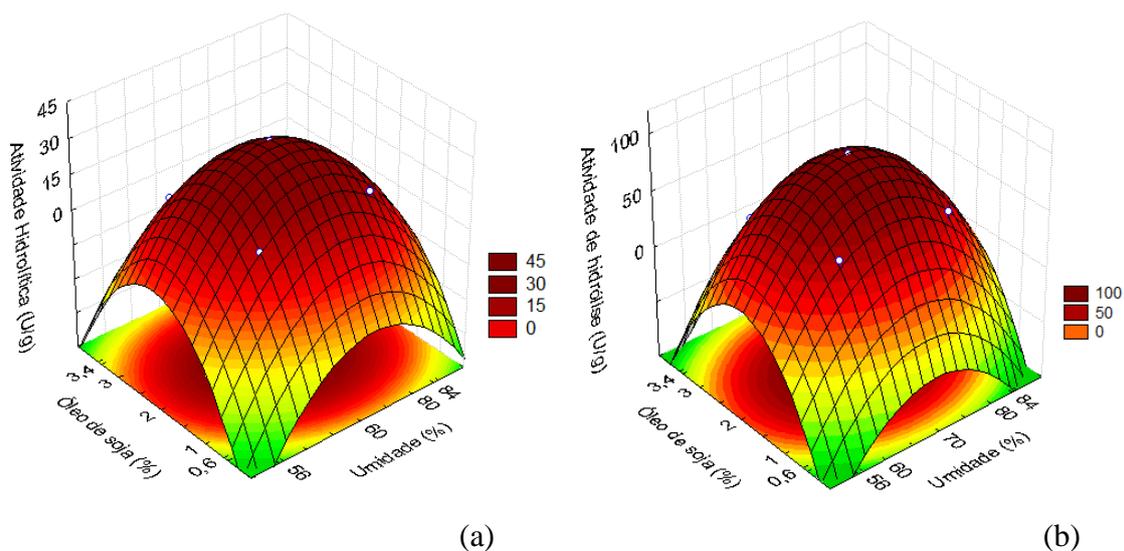


Figura 7 - Superfície de respostas para atividade hidrolítica (a) 72 horas de fermentação e (b) 96 horas de fermentação ambas utilizando *P. brevicompactum* e farelo de mamona.

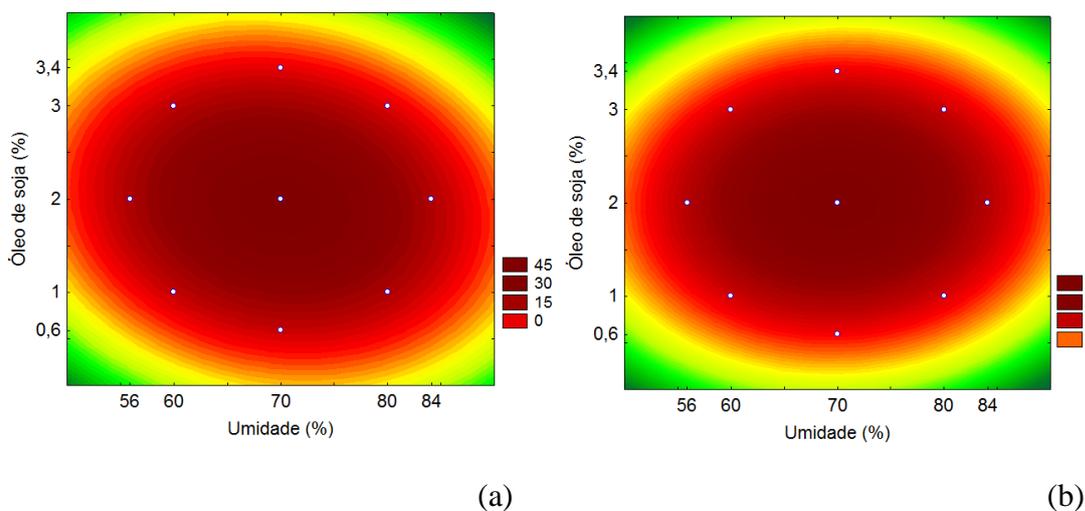


Figura 8 - Curvas de contorno para atividade hidrolítica (a) 72 horas de fermentação e (b) 96 horas de fermentação ambas utilizando *P. brevicompactum* e farelo de mamona.

Alguns estudos para produção de lipase em FES indicaram a necessidade de 70% de umidade em suporte inerte (Avincel) (Chinn *et al.*, 2008) em torta de babaçu (Azeredo *et al.*, 2007; Gutarra *et al.*, 2005; Palma *et al.*, 2000), em farelo de soja (Di Luccio *et al.*, 2004), e esterase em bagaço de beterraba (Asther *et al.*, 2002). Em FES

com bagaço de cana de açúcar a umidade utilizada foi 75%, alcançando bons resultados de produtividade (Rodriguez *et al.*, 2006). Godoy *et al.* (2009) verificaram que a produtividade aumentava quando a a_w estava alta, sendo que após 48 h de fermentação, o decréscimo da umidade e a_w eram observados e, conseqüentemente, a atividade lipásica.

Segundo Rodriguez *et al.* (2006) a suplementação de bagaço de cana de açúcar, para produção de lipase com o fungo *Rhizopus homothallicus* com adição de 0,8% de uréia ao meio sólido proporcionou aumento da atividade em torno de 6 vezes comparada à suplementação com óleo de soja como fonte de carbono, sendo este a concentração intermediária (2%) usada do planejamento, a qual resultou na maior produtividade da enzima.

A adição de lipídios, como fonte adicional de carbono, indicou que estes podem também ser usados como fonte de energia, para produção em escala industrial, no caso, o óleo de oliva e milho. A produção de lipase em FES com *Aspergillus niger* 11T53A14, utilizando farelo de trigo indicou a suplementação do meio com resíduo de refinaria de milho, como promissor indutor, resultando em atividade lipásica de 60 U/g (Damaso *et al.*, 2008).

Conforme Montesinos *et al.* (1996), substratos insolúveis como óleo de soja facilitam a associação de células, permitindo um rápido crescimento celular na presença de ácidos graxos e conseqüentemente uma maior atividade lipásica, quando esse crescimento cessa.

Diferentes estudos têm indicado que o uso de fonte suplementar de carbono em FES pode favorecer a síntese de diferentes enzimas. De acordo com a aplicação desejada, o meio basal pode ser diferentemente enriquecido para crescimento da cultura e/ou a produção de metabólitos, como as enzimas (Rigo, 2009).

Assim, a constituição do meio sólido usado na FES, bem como os indutores aplicados para aumentar a produtividade enzimática, está diretamente relacionada com o grau de dificuldade de recuperação e purificação dos produtos obtidos. A diferença entre as propriedades cinéticas observadas nesta pesquisa podem estar associadas à força de interação das lipases produzidas com os compostos não protéicos dos respectivos meios (Rigo, 2009).

Freire *et al.* (1997a) estudaram como fonte de carbono para produção de lipase por *P. restrictum* o óleo de oliva, a glicose e a lactose. Os resultados demonstraram que

o crescimento celular para o óleo de oliva e a glicose foi semelhante, porém, a atividade enzimática foi cerca de 6 vezes superior com o uso do óleo de oliva, indicando que a produção da enzima pode ser regulada pela glicose. Na presença de lactose não houve crescimento celular e ocorreu baixa produção da enzima, devido ao micro-organismo não metabolizar este açúcar.

Outros trabalhos citados na literatura também investigaram a utilização de diferentes indutores para produção de lipase. Hatzinikolaou *et al.* (1996) estudaram como fonte de carbono para produção de lipase por *Aspergillus niger* o óleo de milho, a glicose, a sacarose e o óleo de oliva, dentre os indutores utilizados o que apresentou melhor resultado foi o óleo de milho a 2% atingindo uma atividade lipásica de 40,5 U/mL.

Um exemplo do aspecto da torta de babaçu e do farelo de mamona no início da fermentação e após 72 e 96 horas pode ser visualizado na Figura 9, onde é possível observar o crescimento do fungo filamentoso nas partículas da torta de babaçu e no farelo de mamona, conferindo aos substratos aparência esverdeada.

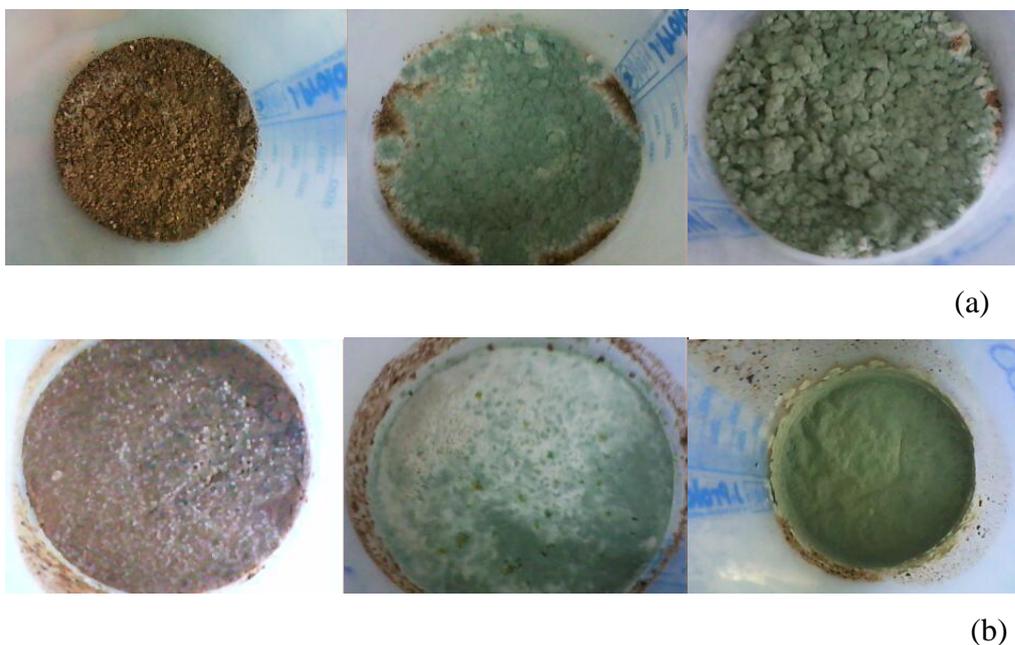


Figura 9 – Aparência dos substratos após período de fermentação: (a) torta de babaçu tempo 0 h, 72 h e 96 h, (b) farelo de mamona tempo 0 h, 72 h e 96 h.

4.3.2 Maximização da atividade de esterificação

Devido à sua estabilidade a temperaturas, valores de pH e solventes orgânicos, esterases tem se tornado objeto de interesse por possuir uma grande gama de aplicações industriais (Schmid, 1998; Herbert, 1992; Jaeger, 1998; Soliman *et al.*, 2007).

A catálise de reações inversas como esterificação acontece, pois o meio reacional aquoso é modificado por um meio bifásico, essa síntese de ésteres pode ser catalisada por ácidos ou bases, mas o uso de tecnologia de enzimas oferece vantagens ambientais e uma redução nos custos de energia. Além disso, a seletividade das lipases pode acarretar em um maior grau de pureza nos produtos obtidos e trocas termodinâmicas para equilibrar reações desejadas (Hilal *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2001; Kraai *et al.*, 2008).

Para o estudo da maximização da atividade de esterificação utilizou-se os extratos obtidos nos planejamentos 5 e 6, liofilizados. A Tabela 20 mostra os valores de atividade de esterificação para o planejamento 5, onde a fermentação foi realizada com torta de babaçu e *P. brevicompactum*.

Tabela 20 - Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas da atividade de esterificação com *P. brevicompactum* e torta de babaçu em 72h e 96h.

Ensaio	Umidade (%)	Óleo de soja (%)	Atividade de esterificação (U/g)	
			Tempo (h)	
			72	96
1	60 (-1)	1 (-1)	47,78	37,84
2	80 (1)	1 (-1)	0,00	90,78
3	60 (-1)	3 (1)	139,93	91,81
4	80 (1)	3 (1)	170,92	93,95
5	56 (-1,41)	2 (0)	174,91	19,37
6	84 (1,41)	2 (0)	67,63	40,25
7	70 (0)	0,6 (-1,41)	13,48	66,46
8	70 (0)	3,4 (1,41)	59,93	55,81
9	70 (0)	2 (0)	232,68	188,34
10	70 (0)	2 (0)	259,34	193,34
11	70 (0)	2 (0)	240,50	182,73

Na Tabela 20 pode-se observar que a atividade de esterificação máxima obtida nos dois tempos analisados ocorreu no ponto central (U=70%/OS=2%), seguido pela condição experimental 5 para 72 horas (U=56%/OS=2%) e pela condição experimental 4 em 96 horas (U=80%/OS=3%). O mínimo obtido nos dois tempos foi encontrado na condição experimental 4 (U=80%/OS=3%) para 72 horas e na condição experimental 5 para 96 horas (U=56%/OS=2%). Nota-se que a produção de lipase de esterificação é influenciada diretamente pela umidade do meio, fato evidente nos ensaios 2 e 4 onde tem-se a mesma umidade com valores de suplementação diferentes, porém a atividade hidrolítica, em 96 horas, sofre pouca variação (90,78 e 93,95 U/g) e nos ensaios 4 e 5 onde tem-se extremos de umidade e pequenas variações de óleo de soja a uma grande variação na atividade hidrolítica para 96 horas (93,95 e 19,37 U/g respectivamente).

Conforme Tweddell *et al.* (1997), quando a interface de atuação da lipase possui água e solvente orgânico (sistema bifásico), sua conformação ativa é favorecida permitindo assim esterificação do meio reacional.

A diminuição da atividade de esterificação em 96 horas pode ser explicada pelo fenômeno de efeito da inibição enzimática pois pela determinação de atividade proteásica, está não foi constatada no meio fermentativo, ou seja, este fenômeno pode conduzir à formação de complexos binários ou terciários entre o complexo que está sendo formado pela lipase que age como catalisador. A concentração desses novos complexos está em equilíbrio com os que estão sendo formados pela lipase, atrapalhando assim as reações de esterificação (Garcia *et al.*, 2000).

Os modelos codificados otimizados para 72 e 96 horas, respectivamente, podem ser visualizados nas Equações 13 e 14, e foram validados pelas análises de variância (ANOVA), apresentadas nas Tabelas 21 e 22. Observa-se que os coeficientes de correlação obtidos (0,91 e 0,92, respectivamente) e os valores de F calculado (2,07 vezes maior que o F_{tab} para as atividades em 72 horas e 2,39 vezes para 96 horas) permitiram a validação do modelo com 95% de confiança. Com os modelos validados foi possível construir as superfícies de resposta apresentadas na Figura 10.

$$AE72 = 244,13 - 21,07*U - 58,86*U^2 + 41,19*OS - 101,40*OS^2 + 19,69*OS*U$$

Equação 13

$$AE96 = 188,01 + 10,60*U - 71,02*U^2 + 5,28*OS - 55,27*OS^2 - 12,70*OS*U$$

Equação 14

ONDE:

AE: Atividade de esterificação em 72 horas e 96 horas de fermentação (U/g farelo seco);

U: Umidade ;

OS :óleo de soja .

Mahadik *et al.* (2002) observam que a produção de lipase é influenciada pelo conteúdo de carbono no meio quando este é de origem lipídica. Ainda, os autores alegam que este comportamento está diretamente relacionado ao mecanismo de regulação do micro-organismo em estudo. Assim, alguns casos relatam que a suplementação do meio com lipídios não é eficiente (Kamini *et al.*, 1998). Kiran *et al.* (2008) mostram que a suplementação de 1% de tributirina proporcionou baixa produção de lipase alcalina de *Pseudomonas* sp.

Tabela 21 - Análise de variância para atividade de esterificação no tempo 72 horas, utilizando *P. brevicompactum* e torta de babaçu.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Fcalculado
Regressão	81484,41	5	16296,88	10,48
Resíduo	7774,92	5	1554,98	
Falta de ajuste	7399,43	3		
Erro puro	375,50	2		
Total	89259,33	10		

$F_{\text{tab},5,5,95\%} = 5,05$ $R^2 = 0,91$

Tabela 22 - Análise de variância para atividade de esterificação no tempo 96 horas, utilizando *P. brevicompactum* e torta de babaçu.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Fcalculado
Regressão	37337,71	5	7467,54	12,11
Resíduo	3083,02	5	616,60	
Falta de ajuste	3026,61	3		
Erro puro	56,41	2		
Total	40420,73	10		

$F_{\text{tab},5,5,95\%} = 5,05$ $R^2 = 0,92$

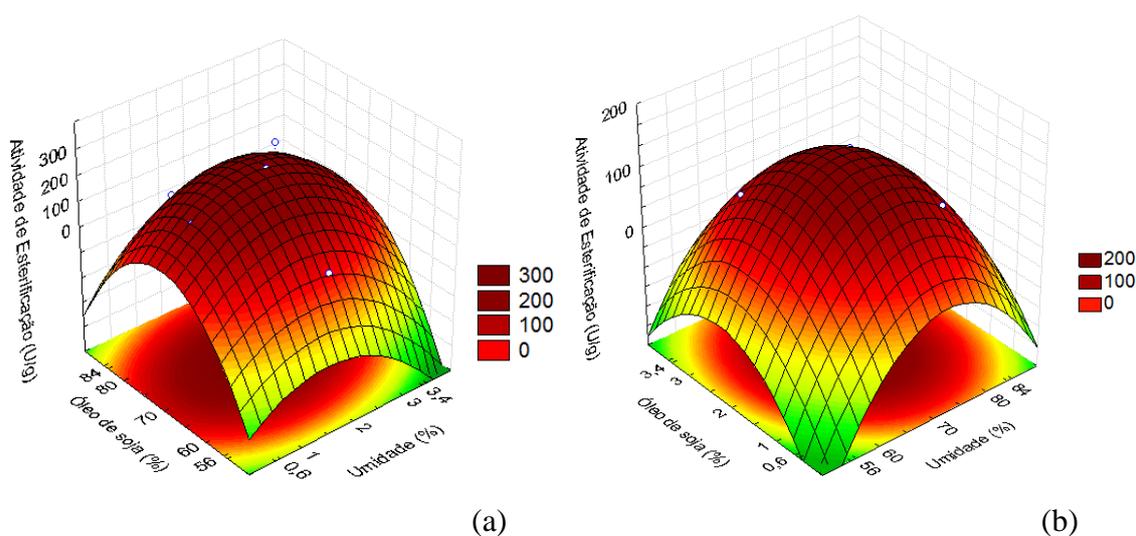


Figura 10 - Superfície de respostas para atividade de esterificação (a) 72 horas de fermentação e (b) 96 horas de fermentação ambas utilizando *P. brevicompactum* e torta de babaçu.

Takaç e Marul (2008) relatam que o tempo necessário para atingir a produção máxima de lipase é dependente do tipo de óleo vegetal usado como suplemento. Contudo, observam que um maior aumento do tempo da fermentação leva à queda da atividade lipásica, independentemente do óleo vegetal usado. Este comportamento foi atribuído à atividade proteásica.

Muitas lipases possuem a capacidade de hidrólise e síntese de ésteres, porém o meio no qual a enzima é produzida pode favorecer a atividade de esterificação devido à enancioseletividade ao substrato da reação (Chen e Sih, 1989; Tawaki e Klibanov, 1993).

A apresentação de uma região ótima de produção é de extrema importância sob a ótica industrial, pois permite que a produção da enzima seja realizada em uma faixa de concentração dos componentes do meio, permitindo oscilações destas no processo, dentro da área estudada.

A Tabela 23 apresenta a matriz do planejamento experimental 6, com os valores da atividade de esterificação quando o meio utilizado foi farelo de mamona e *P. brevicompactum*.

4 Resultados e Discussões

Na Tabela 23 pode-se observar que a atividade de esterificação máxima obtida nos dois tempos analisados ocorreu no ponto central (U=70%/OS=2%), seguido pela condição experimental 4 para 72 horas (U=80%/OS=3%) e pela condição experimental 5 em 96 horas (U=56%/OS=2%). O mínimo obtido nos dois tempos foi encontrado na condição experimental 1,2 e 3 onde se vê que quando as concentrações de carbono são extremas (1% e 3%) ocorre uma inibição.

Tabela 23 - Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas da atividade de esterificação com *P. brevicompactum* e farelo de mamona em 72h e 96h.

Ensaio	Umidade (%)	Óleo de soja (%)	Atividade de esterificação (U/g)	
			Tempo (h)	
			72	96
1	60 (-1)	1 (-1)	0	0
2	80 (1)	1 (-1)	0	0
3	60 (-1)	3 (1)	0	0
4	80 (1)	3 (1)	48,08	0
5	56 (-1,41)	2 (0)	39,89	39,89
6	84 (1,41)	2 (0)	39,25	39,46
7	70 (0)	0,6 (-1,41)	38,52	38,30
8	70 (0)	3,4 (1,41)	39,88	39,73
9	70 (0)	2 (0)	103,68	128,54
10	70 (0)	2 (0)	137,42	138,37
11	70 (0)	2 (0)	125,45	119,98

Os modelos codificados otimizados para 72 e 96 horas respectivamente, (Equações 15 e 16), para a atividade de esterificação foram validados pelas análises de variância (ANOVA), apresentadas nas Tabelas 24 e 25. Observa-se que os coeficientes de correlação obtidos (0,90 e 0,90, respectivamente) e o valor de F (1,65 vezes maior que o F_{tab} para as atividades em 72 horas e 1,63 vezes para 96 horas) validaram o modelo matemático. Com os modelos validados foi possível construir as superfícies de resposta na Figura 11.

$$AE72 = 122,29 + 5,92*U - 48,37*U^2 + 6,27*OS - 48,55*OS^2 + 12,02*OS*U$$

Equação 15

$$\text{AE96} = 129,11 - 0,08*U - 54,74*U^2 + 0,25*OS - 55,08*OS^2$$

Equação 16

ONDE:

AE: Atividade de esterificação em 72 horas e 96 horas de fermentação (U/g farelo seco);

U: Umidade ;

OS :óleo de soja .

Tabela 24 - Análise de variância para atividade de esterificação no tempo 72 horas, utilizando *P. brevicompactum* e farelo de mamona.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Fcalculado
Regressão	21544,29	5,00	4308,86	8,33
Resíduo	2584,85	5,00	516,97	
Falta de ajuste	1999,79	3,00		
Erro puro	585,06	2,00		
Total	24129,14	10,00		

$F_{\text{tab},5,5,95\%} = 5,05$ $R^2 = 0,90$

Tabela 25 - Análise de variância para atividade de esterificação no tempo 96 horas, utilizando *P. brevicompactum* e farelo de mamona.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Fcalculado
Regressão	26160,42	5,00	5232,08	8,27
Resíduo	3163,12	5,00	632,62	
Falta de ajuste	2993,55	3,00		
Erro puro	169,57	2,00		
Total	29323,53	10,00		

$F_{\text{tab},5,5,95\%} = 5,05$ $R^2 = 0,90$

Nahas (1995) estudou a concentração de 1, 2 e 4% de óleo de oliva, óleo de cartamo, óleo de girassol e óleo de milho para produção de lipase por *Rhizopus oligosporus*, verificando uma atividade de 30 U/mL com óleo de girassol como indutor na produção da enzima.

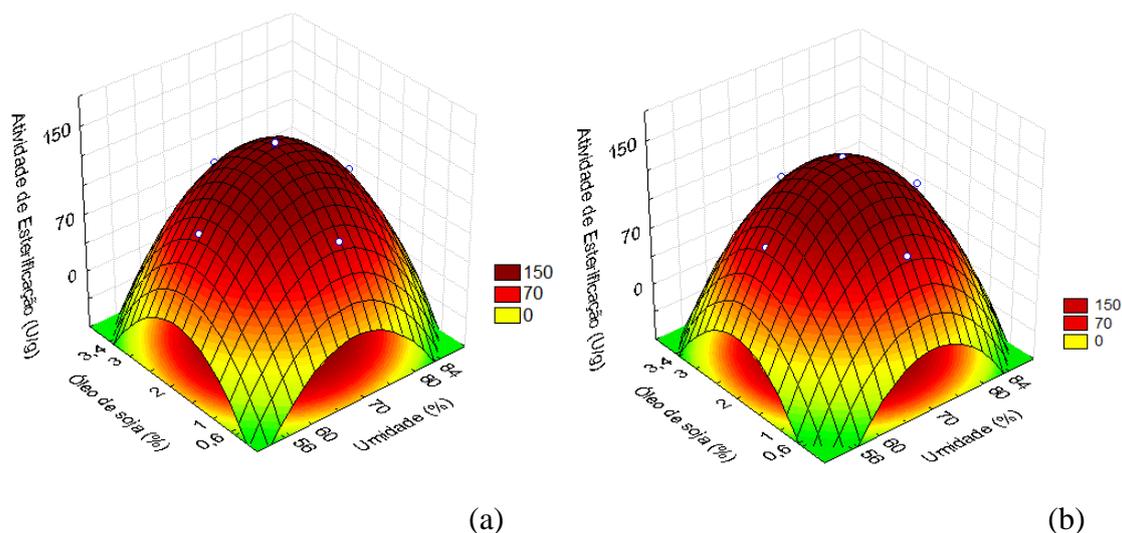


Figura 11 - Superfície de respostas para atividade de esterificação (a) 72 horas de fermentação e (b) 96 horas de fermentação ambas utilizando *P. brevicompactum* e farelo de mamona.

Segundo Wang *et al.* (2008) a produção de lipase pode ser induzida por diferentes substratos lipídicos, mas o mecanismo envolvido ainda está sob investigação. O papel destes substratos na sua síntese e secreção ainda está pouco esclarecido.

Akhtar *et al.* (1980) relataram aumentos da produção de lipases de *Mucor hiemalis* em cultivos suplementados com 1% de óleo de oliva e 5 a 10 mM de Ca^+ em diferentes tempos de fermentação.

A produção de lipases por fungo entomopatogênicos *Beauveria bassiana* produziu uma lipase extracelular em meio de cultura contendo 2% de óleo de oliva (Hegedus e Khachatourians, 1988). Silva *et al.* (2005) demonstraram que meios basais suplementados com diferentes lipídeos e surfactantes melhoraram a produção de lipases por *Metharhizium anisopliae*, isso pode acontecer devido à presença de ligações éster na estrutura química deste surfactante.

4.3.3 Concentração do extrato enzimático por precipitação com sulfato de amônio

A técnica de precipitação das proteínas com sais é considerada uma ferramenta importante para concentração de proteínas. O processo de concentração promove a separação das proteínas da maioria dos demais compostos do meio, facilitando os processos subsequentes (Martins, 2001). A concentração pela adição de sais, como sulfato de amônio, baseia-se no aumento da força iônica, de tal forma que as moléculas protéicas se agregam e precipitam (Borzani *et al.*, 2001).

Neste estudo foi utilizado o extrato aquoso liofilizado obtido nos planejamentos 5 e 6, sendo que as análises foram feitas em cinética 0h, 24h, 48h, 72h e 96h, os pontos escolhidos foram os que tiveram maior atividade de esterificação.

A faixa de concentração de 60-70% de saturação foi descrita como adequada para precipitação de enzimas produzidas com diferentes micro-organismos e substratos (Sun *et al.*, 2008; Shu *et al.*, 2006; Kanwar *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2002; Prazeres *et al.*, 2006).

A Tabela 26 mostra a matriz do planejamento experimental (5) para atividade de esterificação e atividade hidrolítica do extrato aquoso precipitado obtido da FES com *P. brevicompactum* e farelo de babaçu em 72h e 96 h.

A análise estatística dos resultados de atividade lipásica permitiu a obtenção dos efeitos das variáveis estudadas. Os efeitos foram expressos na forma de gráficos de Pareto apresentados nas Figuras 12 e 13. É interessante observar na Tabela 26 que ocorre um declínio nas atividades maximizadas com o extrato bruto, este fenômeno pode estar acontecendo pela alta saturação empregada no experimento fazendo com que a proteína se desnature. Os maiores valores encontrados para o extrato precipitado para atividade hidrolítica foi em 72 horas no ensaio 7 ($U\%=70/OS=0,6\%$), e para atividade de esterificação foi em 72 horas no ensaio 4.

Tabela 26 - Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas da atividade de esterificação e atividade hidrolítica do extrato precipitado obtido da FES com *P. brevicompactum* e farelo de babaçu em 72h e 96 h.

Ensaio	Umidade (%)	Óleo de soja (%)	Atividade Hidrolítica (U/g)		Atividade de esterificação (U/g)	
			Tempo (h)		Tempo (h)	
			72	96	72	96
1	60 (-1)	1 (-1)	0,00	52,66	28,23	77,28
2	80 (1)	1 (-1)	0,00	0,00	0,00	0,00
3	60 (-1)	3 (1)	18,10	13,39	79,95	22,98
4	80 (1)	3 (1)	33,53	5,25	207,40	106,56
5	56 (-1,41)	2 (0)	95,51	120,45	0,00	0,00
6	84 (1,41)	2 (0)	138,70	76,21	0,00	120,45
7	70 (0)	0,6 (-1,41)	227,57	19,74	38,42	60,13
8	70 (0)	3,4 (1,41)	15,00	40,56	35,50	31,73
9	70 (0)	2 (0)	45,84	30,72	39,08	40,90
10	70 (0)	2 (0)	42,97	35,17	41,09	41,20
11	70 (0)	2 (0)	48,71	39,63	42,06	39,70

De acordo com estudos apresentados na literatura, a precipitação de lipases com sulfato de amônio em distintas concentrações varia de acordo com as referidas pesquisas. As concentrações indicadas variam de 80% a 20% de saturação do sal. Para lipases produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* (Karadzic *et al.*, 2006), *Pseudomonas fluorescens* (Makhzoum *et al.*, 1995) e *Aspergillus niger* (Carvalho *et al.*, 2005), foi usada a concentração de sulfato de amônio de 80% de saturação. Algumas lipases foram ainda precipitadas com 70% de saturação, como a de *Antrodia cinnamomea* (Shu *et al.*, 2006) e *Bacillus* sp. RSJ-1 (Sharma *et al.*, 2002); 60% a de *Bacillus coagulans* MTCC-6375 (Kanwar *et al.*, 2006) e *Antrodia cinnamomea* (Shu *et al.*, 2006); 40% para a de *Clostridium tetanomorphum* (Petersen e Daniel, 2006) e 20% a proveniente de *Favobacterium odoratum* (Labuschagne *et al.*, 1997).

Pela Figura 12 observa-se que a variável óleo de soja apresenta um efeito significativo negativo, a umidade efeito significativo positivo e a interação entre as

variáveis umidade e óleo de soja efeito significativo positivo, comportamento este para 72 horas e em 96 horas.

Pelo Gráfico de Pareto (Figura 13) é possível avaliar os principais efeitos e interações das variáveis estudadas na atividade de esterificação do extrato precipitado. Observou-se que, com 95% de confiança, em 72 horas somente a variável umidade quadrática apresenta efeito negativo sobre a atividade de esterificação. Para 96 horas todas as variáveis apresentam efeito positivo sobre a atividade de esterificação.

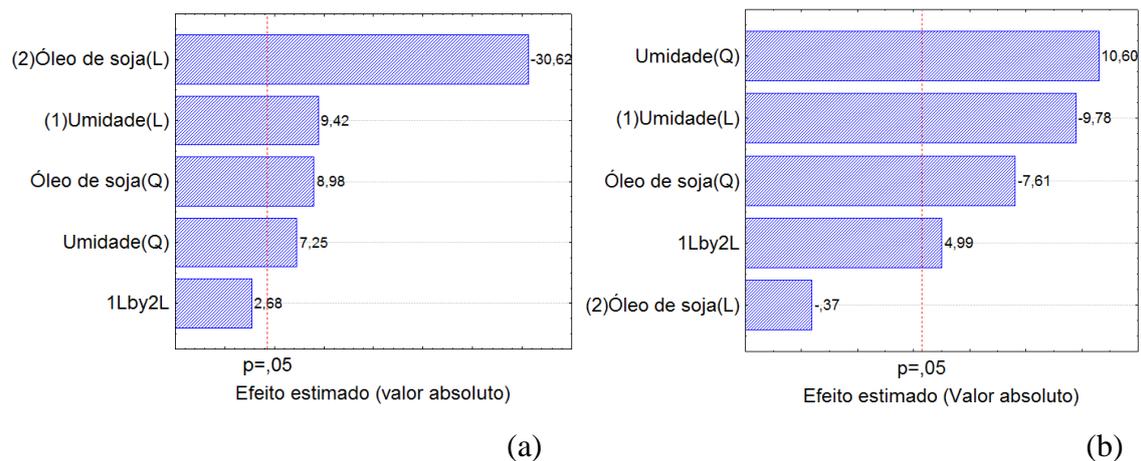


Figura 12 - Efeitos das variáveis manipuladas sobre a atividade hidrolítica do extrato precipitado obtido da FES de *P. brevicompactum* em torta de babaçu, (a) análise em 72 horas e (b) análise em 96 horas.

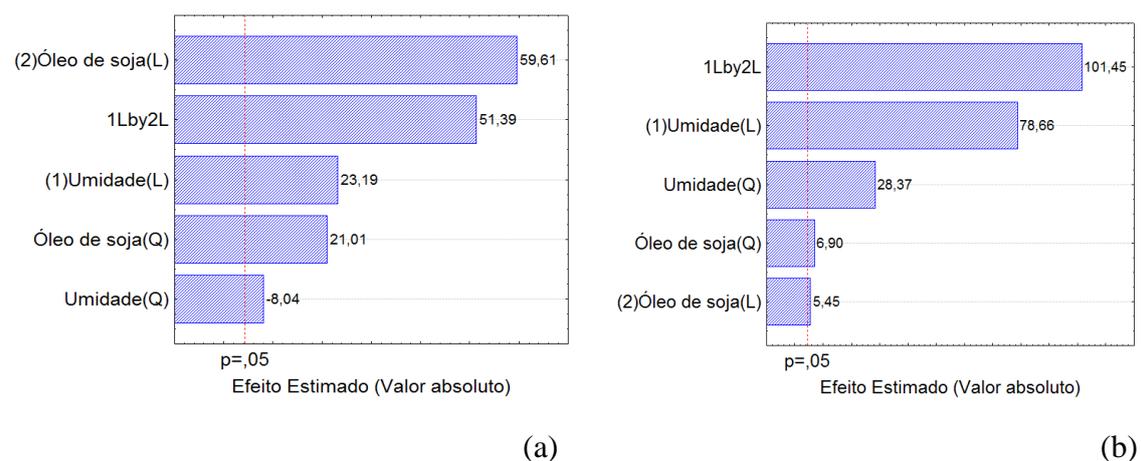


Figura 13 - Efeitos das variáveis manipuladas sobre a atividade de esterificação do extrato precipitado obtido da FES de *P. brevicompactum* em torta de babaçu, (a) análise em 72 horas e (b) análise em 96 horas.

Apesar da importância do estudo da purificação da enzima é preciso considerar que por mais adequado que seja o processo escolhido, este sempre vai causar alterações na enzima. Redução da atividade enzimática, alterações de temperatura e pH ótimo de atuação e de estabilidade são algumas das características que podem ser afetadas com o processo de purificação (Maldonado, 2006).

Philips e Pretorius (1991) purificaram e caracterizaram a lipase extracelular de *Galactomyces geotrichum*, um fungo teleomorfo do *Geotrichum candidum* e compararam as características das duas enzimas. A quantidade máxima de lipase produzida pelo *Galactomyces geotrichum* foi observada após 24-36 horas de incubação e meio preparado com óleo de oliva. A lipase modificada mostrou ter diferente composição de aminoácidos em relação a lipase de *G. candidum*. A atividade máxima da enzima de *G. geotrichum* obtida foi a pH 7,75 e 30°C e a mesma perdeu toda atividade quando submetida a tratamento a 56°C por 35 minutos.

Macedo *et al.* (2004) estudaram a produção de lipase por *Geotrichum* sp., em frascos agitados, nas condições operacionais de 30°C por 48 horas de incubação com 100 rpm de agitação. A lipase de *Geotrichum* sp. apresentou atividade máxima de 6 U/mL na faixa de pH 5 a 8 a 45°C. A atividade enzimática foi acrescida em 45% na presença de 1 mmol/L de MgSO₄ no sistema de reação.

A lipase de *Aspergillus carneus* foi purificada por cromatografia de interação hidrofóbica obtendo-se um fator de purificação de 24 vezes e uma recuperação da atividade de 38%. A enzima apresentou pH e temperatura ótimos de 9,0 e 37°C, respectivamente. Foi estável na faixa de pH 8 a 10 por 24 horas e por 5 minutos à temperatura de 70°C (Saxena *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos de atividade de esterificação e atividade hidrolítica do extrato enzimático precipitado obtido por FES de *Penicillium brevicompactum* em farelo de mamona podem ser visualizados na Tabela 27.

Tabela 27 - Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas da atividade de esterificação e atividade hidrolítica do extrato precipitado obtido da FES com *P. brevicompactum* e farelo de mamona em 72h e 96 h.

Ensaio	Umidade (%)	Óleo de soja (%)	Atividade hidrolítica (U/g)		Atividade de esterificação (U/g)	
			Tempo (h)		Tempo (h)	
			72	96	72	96
1	60 (-1)	1 (-1)	0,00	63,36	20,94	98,79
2	80 (1)	1 (-1)	0,00	128,26	0,00	0,00
3	60 (-1)	3 (1)	7,86	2,86	70,44	0,00
4	80 (1)	3 (1)	0,00	0,00	74,68	72,01
5	56 (-1,41)	2 (0)	28,66	115,18	98,00	44,76
6	84 (1,41)	2 (0)	0,00	0,00	0,00	77,01
7	70 (0)	0,6 (-1,41)	57,12	49,71	72,75	78,90
8	70 (0)	3,4 (1,41)	106,35	0,00	71,83	0,00
9	70 (0)	2 (0)	13,11	33,89	119,75	110,37
10	70 (0)	2 (0)	17,53	29,55	105,31	115,99
11	70 (0)	2 (0)	12,46	33,18	115,65	107,53

Se os resultados obtidos para a atividade de esterificação do extrato bruto (Tabelas 15 e 23) forem comparados com as atividades de esterificação do extrato precipitado nota-se que não ocorre um aumento significativo. Contudo, para a atividade hidrolítica ocorre uma grande variação nos resultados obtidos. Essa variação de atividade pode ocorrer devido a queda de pH ao se adicionar o sulfato de amônio, podendo assim desnaturar a enzima.

Na Figura 14 visualizam-se os efeitos das variáveis de processo na atividade de esterificação para 72 e 96 horas e para a atividade hidrolítica em 72 e 96 horas. A análise em 72 horas permite observar que o óleo de soja apresenta efeito significativo para a atividade hidrolítica no extrato precipitado, para 96 horas a umidade quadrática exerce influência significativa positiva ($p < 0,05$) na produção de lipase hidrolítica. Para a lipase com atividade de esterificação o efeito positivo significativo foi apresentado pela variável óleo de soja, umidade e a interação entre elas e em 96 horas a interação entre as variáveis e a umidade exercem influência significativa positiva ($p < 0,05$).

4 Resultados e Discussões

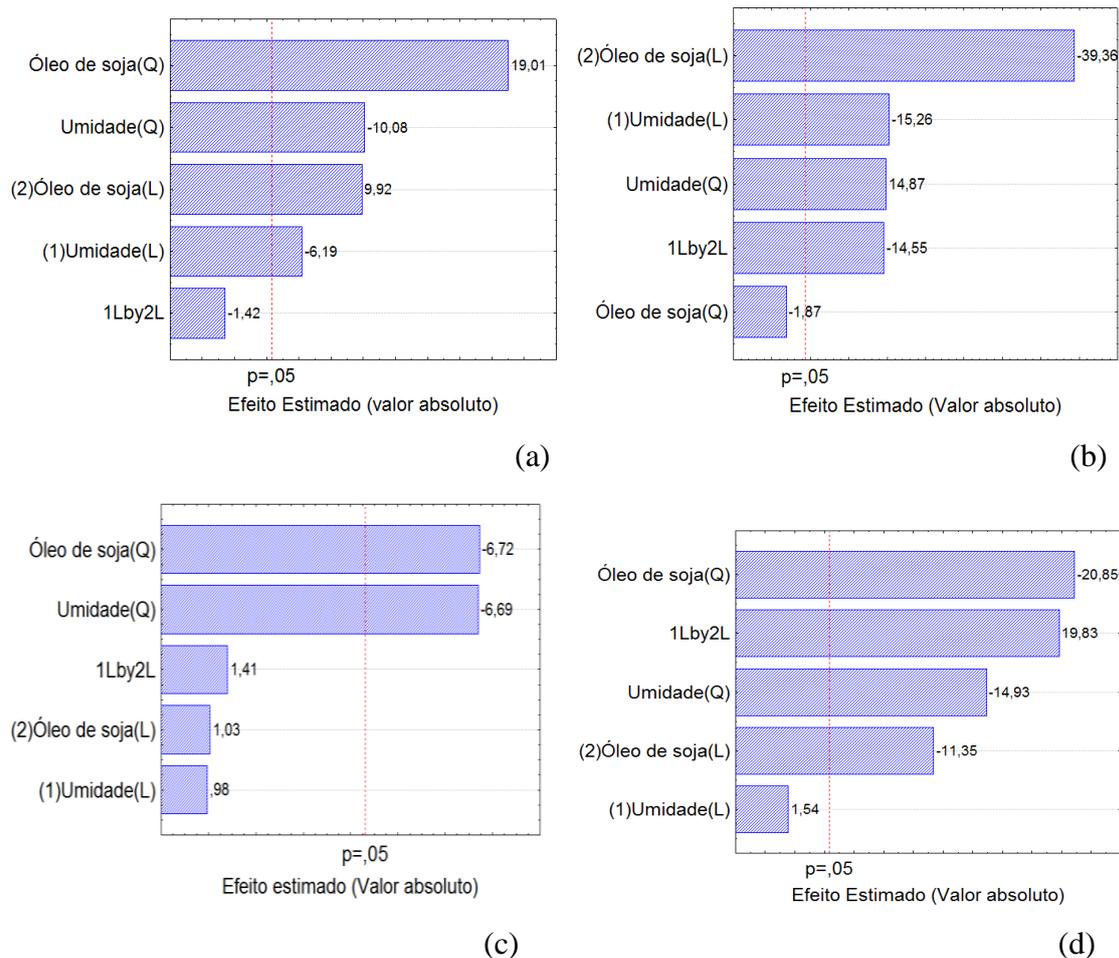


Figura 14 - Efeitos das variáveis manipuladas sobre a atividade hidrolítica do *P. brevicompactum* em farelo de mamona, (a) análise em 72 horas , (b) análise em 96 horas e sobre a atividade de esterificação (c) análise em 72 horas e (d) análise em 96 horas, ambas do extrato precipitado.

No caso da lipase de *Pseudomonas* sp. (MSI057) a precipitação foi realizada com 80% de saturação, resultando em fator de purificação de 6,62. Com atividade específica de 0,99 U/mg as propriedades da enzima purificada foram avaliadas, principalmente o efeito da adição de diferentes íons na atividade da lipase, sendo os íons Zn^{2+} e Co^{2+} considerados ativadores (Kiran *et al.*, 2008).

Lin *et al.* (1996) purificaram uma lipase alcalina de *P. pseudoalcaligenes*, que mostrou maior afinidade por grupos acil C₁₄ quando utilizou como substrato p-nitrofenil.

A Tabela 28 apresenta a atividade específica dos quatro melhores pontos de atividade de esterificação, os quais serão posteriormente imobilizados e testados em uma reação de alcoólise de óleo vegetal.

Tabela 28 - Atividade específica dos extratos enzimáticos obtidos por FES de *P. brevicompactum* com torta de babaçu e farelo de mamona, respectivamente.

Substrato		Atividade de esterificação		
		U/g	Proteína (mg/g)	Ativ. Específica (U/mg)
Babaçu	Extrato Bruto	170	4,99	34,07
	Extrato Precipitado	207	1,39	149,9
Mamona	Extrato Bruto	138	3,75	36,8
	Extrato Precipitado	110	15,28	7,20

Pela Tabela 28 verifica-se que a maior atividade específica foi encontrada no extrato precipitado obtido da FES que utilizou como substrato torta de babaçu seguida pela atividade do extrato sem concentração do estudo da fermentação com *P. brevicompactum* e farelo de mamona.

Atividades específicas menores foram encontradas por Shu *et al.* (2006) (12,7 U/mg) precipitando lipase de *Antrodia cinnamomea* com 70% de saturação. Jesus *et al.* (1999) obtiveram 14,1 U/mg com 80% de saturação na precipitação de lipases de *Penicillium restrictum* e Kanwar *et al.* (2002), precipitando lipase de *Pseudomonas* com 60% de saturação, atingiram uma atividade máxima de 19,46 U/mg. Sharma *et al.* (2002) obtiveram 44,82 U/mg na precipitação de lipases de *Bacillus* sp. RSJ – 1 com 30% a 70% de saturação. Pastore *et al.* (2003), na precipitação de lipase de *Rhizopus* sp. com 70% de saturação, alcançaram 103 U/mg. Abbas *et al.* (2002), na precipitação de lipases de *Mucor* sp. com 75% de saturação, atingiram 129 U/mg e Bacha *et al.* (2005)

encontraram 521 U/mg de atividade precipitando lipase de pâncreas de avestruz a 60% de saturação com sulfato de amônio.

Observa-se, portanto, que há uma diferença significativa entre as atividades encontradas na literatura, variando de acordo com a condição experimental e o micro-organismo utilizado, o que justifica o confronto criterioso que deve ser realizado entre os resultados obtidos neste trabalho e os citados na literatura.

4.3.4 Imobilização de lipases

Para o estudo de imobilização foram escolhidos os quatro melhores resultados em termos de atividade (2 pontos do extrato bruto e 2 pontos de extrato precipitado). A técnica de imobilização testada neste trabalho foi otimizada por Menoncin (2007).

A Tabela 29 mostra os resultados obtidos para atividade de esterificação e atividade hidrolítica para os pontos selecionados em 72 e 96 horas, quando imobilizadas em Accurel e solução de alginato de sódio com carvão ativado.

Na Tabela 29 pode-se observar que a enzima imobilizada com a solução de alginato de sódio e carvão ativado apresentou melhores resultados para atividade de esterificação do que para atividade hidrolítica. Estes resultados são muitos promissores, pois o carvão ativado tem um baixo custo e existem poucos relatos na literatura quanto ao uso deste suporte na imobilização de lipases (Kaewthong *et al.*, 2005).

Observa-se que o rendimento obtido em ambos os suporte utilizados foi maior que 20%, significando que o suporte utilizado pode não ser o ideal, pois a enzima possui pouca afinidade com o mesmo.

Com base nestes resultados pode-se observar que os mesmos foram menores que alguns reportados na literatura. Kaewthong *et al.* (2005), imobilizando a lipase PS (Amano) em diferentes suportes, obtiveram rendimentos de 37,16% para Accurel EP100 (<200 μm). Quando esta mesma lipase foi imobilizada em Accurel EP 100 (200-400 μm) o rendimento encontrado foi de 31,10%, em carbonato de cálcio 0,79%, 3,56% em Celite, 6,42% em Sílica Gel e 0,36% em Carvão Ativado.

Tabela 29 – Resultados obtidos para imobilização com accurel e solução de alginato de sódio e carvão ativado.

Parâmetros	Atividade hidrolítica (U/g)			Atividade de esterificação (U/g)	
	Rend. (%)	Accurel	Alginato +carvão	Accurel	Alginato +carvão
Ensaio 4 72 horas (80%U/3%OS) ppto torta de babaçu	20,34	0,00	2,14	22,15	26,05
Ponto Central 72 horas (70%U/2%OS) extrato bruto torta de babaçu	19,89	9,13	10,46	15,09	42,79
Ponto Central 96 horas (70%U/2%OS) extrato bruto farelo de mamona	22,56	12,45	16,89	30,12	39,67
Ponto Central 96 horas (70%U/2%OS) extrato ppto farelo de mamona	27,3	8,12	5,67	35,18	45,67

Segundo estudos realizados por Rocha *et al.*, (1998), não só o pH do meio como também o tampão utilizado, podem influenciar no processo de imobilização. Brígida (2006) testou diferentes pHs com tampão 25 mM para verificar essa interferência na imobilização de *Candida antarctica* em fibra de côco verde. A análise dos dados permite verificar que entre pH 3 e 6, a imobilização é mais eficiente já que as cargas opostas tendem a aumentar a atração da enzima ao suporte.

Embora mais estável, o perfil de desativação da enzima imobilizada por adsorção é igual ao da enzima livre. Isto se deve ao fato de as enzimas estarem expostas na superfície do suporte (Arroyo *et al.*, 1999).

Em termos de retenção de atividade, Knezevic *et al.* (2002), imobilizando lipases de *Candida rugosa* em diferentes concentrações de alginato, obtiveram retenção máxima de 79,99%, sendo esta muito superior que à encontrada neste estudo.

As enzimas imobilizadas com Accurel EP100 e solução de Alginato de sódio com carvão ativado podem ser visualizadas na Figura 15.

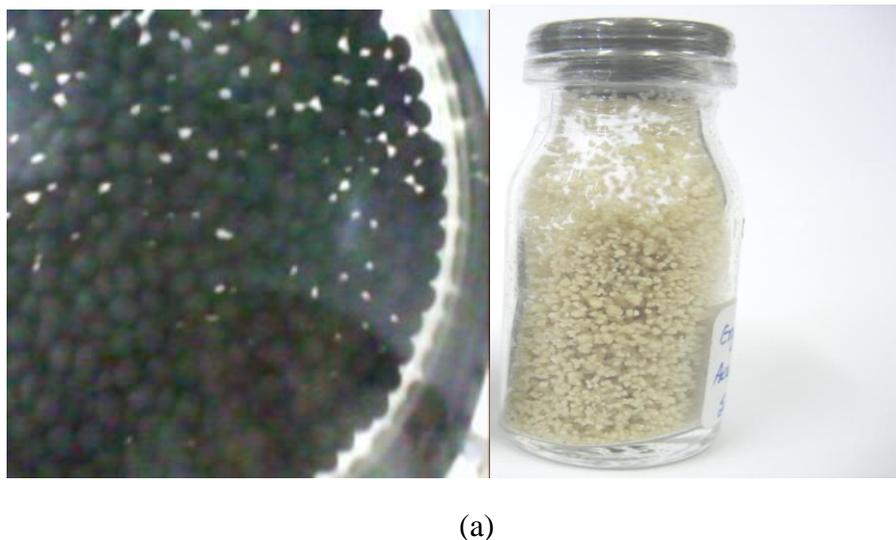


Figura 15 – Enzimas imobilizadas em (a) solução de alginato de sódio com carvão ativado e (b) Accurel EP100.

Em geral o suporte pode conferir uma maior estabilidade térmica e aumentar o tempo de uso das enzimas em reações de biocatálise (Arroyo *et al.*, 1999; Moreno *et al.*, 1997). Por outro lado a imobilização de lipases pode conduzir a uma diminuição na sua estabilidade (se o suporte interagir negativamente com a proteína), e também reduzir a atividade catalítica se a conformação da enzima for alterada durante o processo de imobilização, ou seja, alguns dos aminoácidos do centro ativo se envolvem nos laços estabelecidos com o suporte (Foresti e Ferreira, 2007).

O controle de suportes ativados com glutaraldeído é muito importante, pois os monômeros e os dímeros presentes no glutaraldeído apresentam reatividade diferente: enquanto o dímero imobiliza rapidamente proteínas por ligação covalente, o monômero diminui a taxa de imobilização. Isto ocorre devido à presença de compostos iônicos (grupos amins), que promovem uma troca iônica com o suporte, alterando a força iônica durante a imobilização e alterando a região (sítio ativo) onde a enzima faz interação com o suporte (Betancor *et al.*, 2006).

4.3.5 Caracterização Parcial do Extrato Enzimático

4.3.5.1 Estabilidade do Extrato Enzimático à baixas temperaturas

A estabilidade é uma das características requeridas de enzimas com potencial para aplicação industrial, como lipases, uma vez que muitos processos usam temperaturas em torno de 50°C. Lipases microbianas têm sido estudadas com relação à estabilidade. Entretanto, não há padronização nas metodologias, tornando difícil a comparação e o estabelecimento de regras gerais. O que se observa é que a estabilidade destas enzimas varia entre os gêneros, as espécies e até entre isoformas produzidas por uma mesma cepa. Há alguns exemplos de lipases estáveis em temperaturas acima de 70°C, como as lipases de *Bacillus circulans* (Kademi *et al.*, 2000) e *Pseudomonas cepacia* (Sugihara *et al.*, 1992).

A estabilidade do extrato enzimático foi avaliada conservando o extrato enzimático em temperatura de geladeira e de congelamento. O estudo da estabilidade é importante, pelo fato de permitir observar o comportamento da enzima e quanto de sua atividade inicial é preservada ao longo do armazenamento (Wolski, 2008).

A seguir estão apresentados os comportamentos do extrato enzimático em temperatura de congelamento (-10 °C) e de geladeira (4°C).

Estabilidade do extrato enzimático em temperatura de congelamento

Para o estudo de estabilidade neste trabalho, foram usadas 4 amostras: 2 amostras do extrato obtido da FES de *P. brevicompactum* e torta de babaçu (1 amostra, concentrada com 60% de saturação com sulfato de amônio, e outra do extrato bruto) e 2 amostras do extrato obtido da FES de *P. brevicompactum* e farelo de mamona (1 amostra concentrada, com 60% de saturação com sulfato de amônio e outra extrato bruto), escolhidas por apresentarem valores promissores na atividade de esterificação.

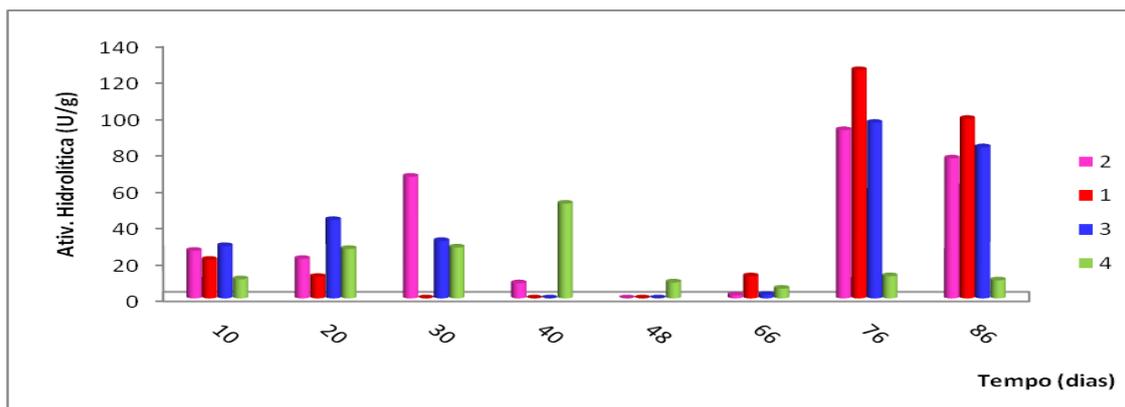
O extrato enzimático produzido por *Penicillium brevicompactum* foi estocado durante 86 dias em congelador, na temperatura de -10°C. Neste período foram determinadas as atividades de esterificação e hidrolítica a cada dez dias.

Na Figura 16 estão apresentados os resultados encontrados para o acompanhamento da atividade hidrolítica e de esterificação, respectivamente, do extrato enzimático bruto e precipitado durante o armazenamento em temperatura de congelamento (-10°C) no período de 86 dias.

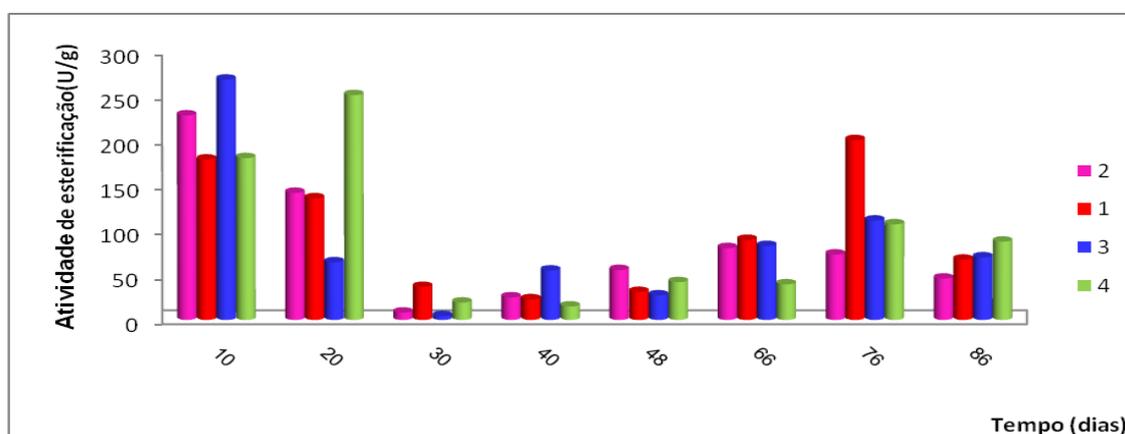
De acordo com os valores apresentados na Figura 16(a), pode-se verificar que até o 20° dia de armazenamento, a atividade hidrolítica da lipase se manteve razoavelmente constante, no 30° dia aumentou, porém do 31° dia até o 66° dia diminuiu e no 76° dia aumentou. Na Figura 16(b) a atividade de esterificação da lipase manteve o mesmo comportamento manteve-se constante até o 20° dia, decrescendo até o 66° dia, aumentando a partir do 76° dia e voltando a decrescer no 86° dia. De acordo com Menoncin (2007), esse aumento pode ser explicado pelo fato de que algumas enzimas podem se regenerar. Isso se deve ao fato da modificação das conformações terciárias das proteínas quando submetidas a baixas temperaturas.

Para Wolski (2008), o extrato enzimático obtido a partir de *Penicillium* sp. Obteve um aumento em sua atividade hidrolítica até o 92° dia com 7 U/mL, após esse período a atividade começa a cair até sua inativação em 177 dias.

Segundo Menoncin (2007), atividade hidrolítica do extrato enzimático bruto obtido da FES de *P. verrucosum* e farelo de soja, decresce até o 98° dia de armazenamento. Após este período a atividade aumenta, sendo este aumento mantido durante os demais dias de armazenamento, com 218 dias a enzima permanecia com 80% de sua atividade inicial. A termoestabilidade da enzima *Bacillus* sp. foi aumentada pela adição de estabilizadores como etileno glicol, sorbitol e glicerol fazendo com que a enzima mantivesse sua atividade por 150 minutos a 70°C (Nawani e Kaur 2000).



(a)



(b)

Figura 16 – Estabilidade para o extrato enzimático armazenado em congelador

(-10°C), (a) atividade hidrolítica e (b) atividade de esterificação. Amostra

1- Planejamento 5, ensaio 4 72 horas e extrato precipitado; Amostra 2 - Planejamento 5, ponto central, 72 horas e extrato bruto; Amostra 3 – Planejamento 6, ponto central, 96 horas e extrato bruto e Amostra 4 – Planejamento 6, ponto central, 96 horas e extrato precipitado.

Estabilidade do extrato enzimático em temperatura de geladeira

Para o estudo de estabilidade neste trabalho, foram usadas 4 amostras: 2 amostras do extrato obtido da FES de *P. brevicompactum* e torta de babaçu (1 amostra concentrada, com 60% de saturação com sulfato de amônio, e outra do extrato bruta) e 2

amostras do extrato obtido da FES de *P. brevicompactum* e farelo de mamona (1 amostra concentrada, com 60% de saturação com sulfato de amônio, e outra extrato bruto) sendo que estes pontos mostraram valores promissores na atividade de esterificação.

O extrato enzimático obtido a partir de *Penicillium brevicompactum* foi estocado durante 86 dias em geladeira, na temperatura de 4°C. Neste período foram determinadas as atividades de esterificação e hidrolítica em intervalos de tempos regulares a cada dez dias.

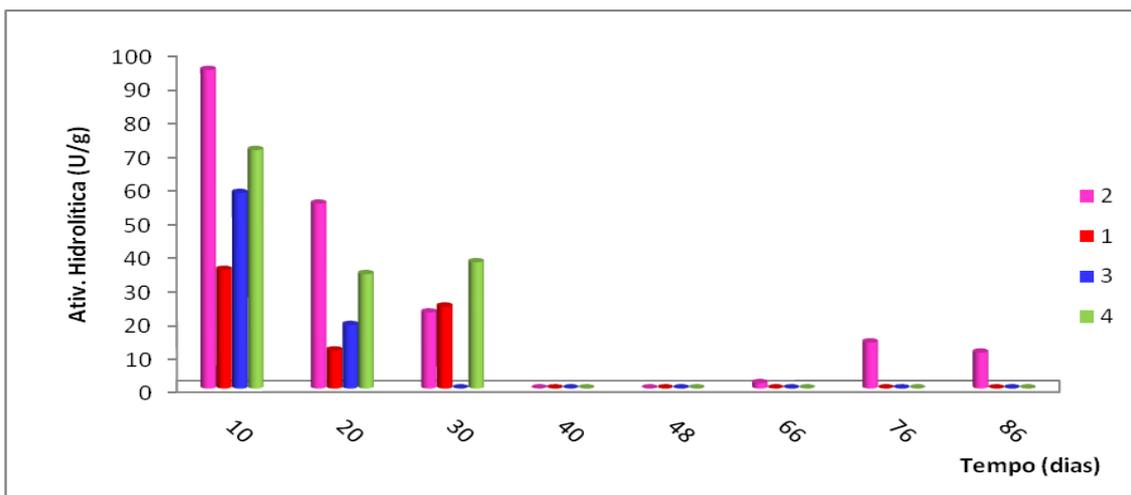
Na Figura 17 estão apresentados os resultados encontrados para o acompanhamento da atividade hidrolítica e de esterificação, respectivamente, do extrato enzimático durante o armazenamento em temperatura de geladeira (4°C) durante 86 dias.

De acordo com os valores apresentados na Figura 17(a), pode-se verificar que a maior atividade hidrolítica é obtida após 10 dias de incubação, do 20° até o 48° dias as atividades decaem até sua inativação porém no 68° ocorre um acréscimo na atividade sugerindo que a enzima possui o potencial de se autoregenerar, devido a capacidade da enzima em modificar sua estrutura terciária ao ser submetidas a baixas temperaturas. Na Figura 17(b) a atividade de esterificação da lipase do 10° ao 20° dia aumenta gradativamente até atingir seu pico no 30° dia, após decresce e mantém sua atividade do 40° até o 86° dia.

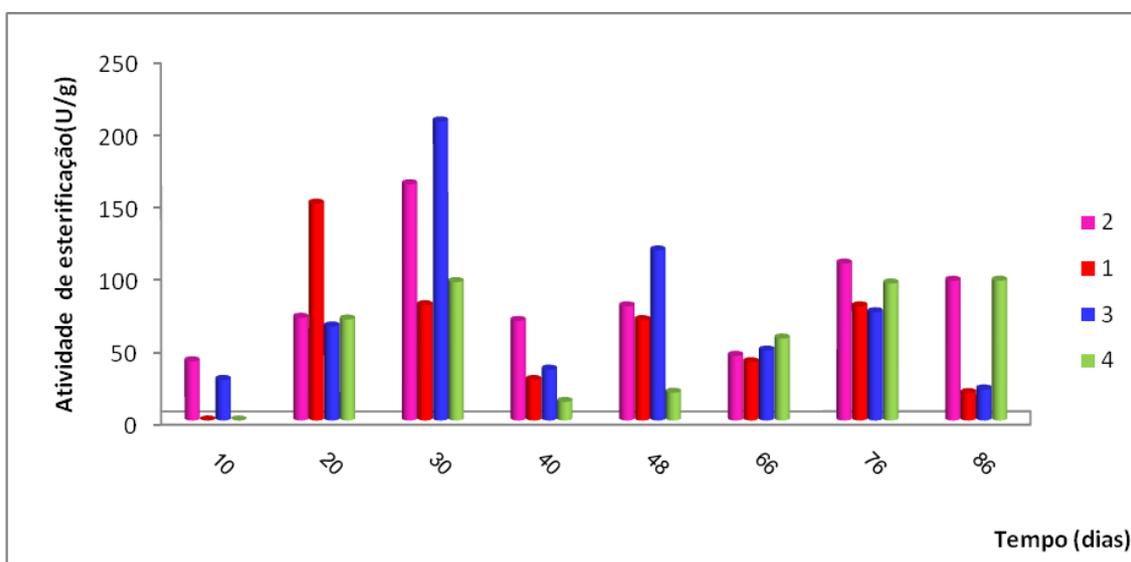
Lin (1996) testou a estabilidade de *Pseudomonas pseudoalcaligenes F111* em solvente orgânico e adição de íons cálcio a 4°C por 24 horas verificando que após este período a enzima manteve 20% de sua atividade.

Conforme caracterização bioquímica de Hiol *et al.* (2000), a lipase produzida por *S. aureus* NCTC 8530 tem sua atividade estabilizada em pH ótimo ao redor de 6.

A estabilidade da lipase está obviamente ligada com sua estrutura, que pode ser afetada por mudança de pH ou presença de íons metálicos. Em alguns casos sua desnaturação térmica ocorre quando o desdobramento dos polipeptídeos no sítio ativo fica em estado intermediário (Zhu *et al.*, 2001). A estabilidade de uma enzima pode ser aumentada se for empregada a técnica de imobilização (Xu *et al.*, 1995; Reetz *et al.*, 1996; Arroyo *et al.*, 1999; Hiol *et al.*, 2000).



(a)



(b)

Figura 17 - Estabilidade para o extrato enzimático armazenado em geladeira (4°C), (a) atividade hidrolítica e (b) atividade de esterificação. Amostra 1 - Planejamento 5, ensaio 4 72 horas e extrato precipitado; Amostra 2 - Planejamento 5, ponto central, 72 horas e extrato bruto; Amostra 3 - Planejamento 6, ponto central, 96 horas e extrato bruto e Amostra 4 - Planejamento 6, ponto central, 96 horas e extrato precipitado.

4.3.5.2 Especificidade do extrato enzimático

Especificidade do extrato enzimático frente a diferentes alcoóis e ácidos graxos

As taxas de reações de síntese e o método de dosagem de atividade são controlados por diferentes variáveis, tais como, a fonte e atividade catalítica da enzima, o tipo de reação, o substrato, e o solvente usado, bem como a temperatura (Ruiz *et al.*, 2008). A estabilidade da enzima e a sua atividade em solventes orgânicos dependem não somente das propriedades e concentrações do solvente orgânico, mas também da natureza da enzima (Torres e Castro, 2004).

Desta forma, no presente trabalho, realizou-se a avaliação do efeito de diferentes álcoois e ácidos na atividade catalítica da lipase produzida através de fermentação em estado sólido. Altos rendimentos nas reações de esterificação começa pela escolha do meio da reação (Bloomer *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1988; Molinari *et al.*, 1996 *apud* Leblanc *et al.*, 1998)

Os dados apresentados na Figura 18 mostram a influência de diferentes álcoois (etanol, metanol, propanol e butanol) na atividade de esterificação com ácido oléico. Observa-se que enzimas obtidas da fermentação com torta de babaçu (amostra 1 e 2), no qual o substrato usado na fermentação foi a torta de babacu e apresenta em sua composição ácidos graxos de cadeia média C12:0 (55%), mostra maior afinidade quando o meio no qual está interagindo é de cadeia longa (C18:1) em presença de etanol. Cabe ressaltar que todas amostras mostraram ter boa afinidade com ácidos graxos de cadeia longa em presença de etanol, contudo quando houve a troca do álcool na reação os valores de atividade decresceram.

Comportamento semelhante foi observado por Rigo (2009) na produção de lipase por FES utilizando farelo de soja como substrato e uma cepa de *Penicillium crustosum*, ao adicionar metanol ao invés de propanol na reação com ácido oléico diminuiu a atividade de esterificação de 104,97 (U/g) para 1,57 (U/g). Pode-se dizer que as enzimas usadas nesta reação podem efetuar a síntese de etil oleato.

Dörmo *et al.* (2004) estudaram a influência do tamanho da cadeia do álcool em reações de esterificação com ácido oléico empregando a lipase comercial Novozym 435. Os alcoóis investigados foram etanol, n-propanol, i-butanol e i-pentanol. Os autores

verificaram que os maiores rendimentos foram obtidos com alcoóis menos hidrofílicos (de maior cadeia). Os alcoóis de maiores cadeias estudados foram n-butanol e n-propanol, tendo os mesmos apresentado as maiores conversões.

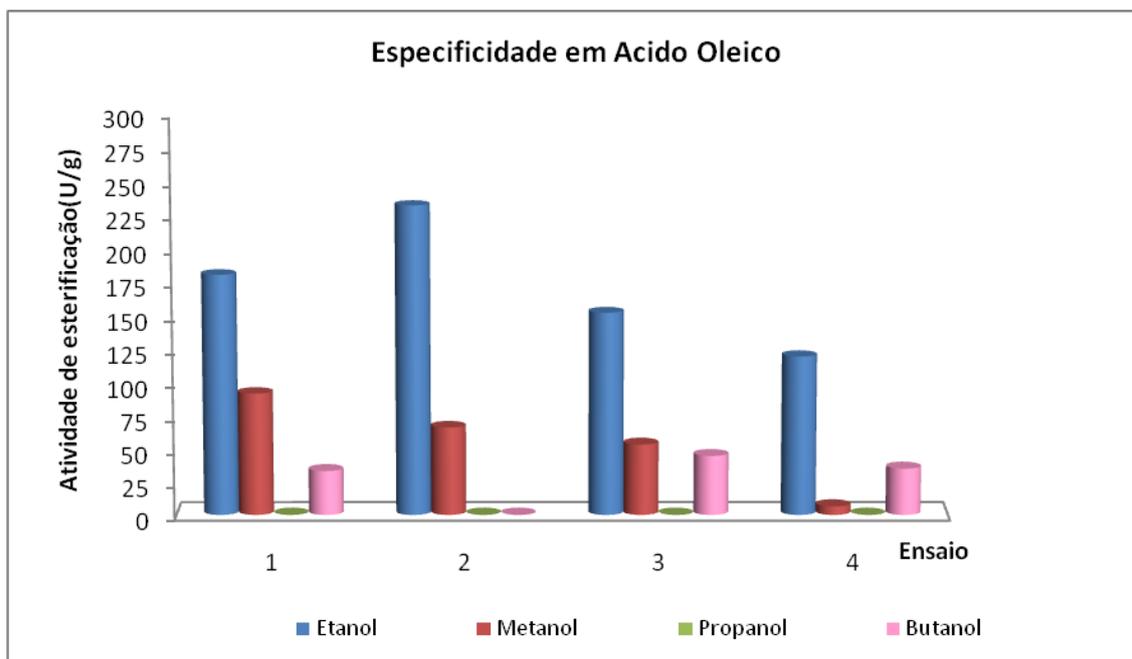


Figura 18 - Especificidade do extrato enzimático da reação do ácido oléico em diferentes alcoóis. Amostra 1 - Planejamento 5, ensaio 4 72 horas e extrato precipitado; Amostra 2 - Planejamento 5, ponto central, 72 horas e extrato bruto; Amostra 3 - Planejamento 6, ponto central, 96 horas e extrato bruto e Amostra 4 - Planejamento 6, ponto central, 96 horas e extrato precipitado.

Em geral, os solventes polares (miscíveis em água) causam maior desestabilização das lipases que os apolares (imiscíveis em água) (Nawani *et al.*, 1998). A atividade lipásica seria altamente dependente da hidrofobicidade do solvente, relacionando-se este fato à existência ou não da camada de água na superfície da enzima. Desta forma, reporta-se que a manutenção da atividade catalítica pode ser favorecida pelo uso de solventes apolares (Hazarika *et al.*, 2002; Sztajer *et al.*, 1992). Embora uma grande maioria das lipases apresente preferência reacional frente a

solventes apolares, são ainda necessárias pesquisas que reportem esta relação (Gupta, 1992).

A Figura 19 apresenta o comportamento da lipase na reação de ácido butírico com etanol, metanol, propanol e butanol.

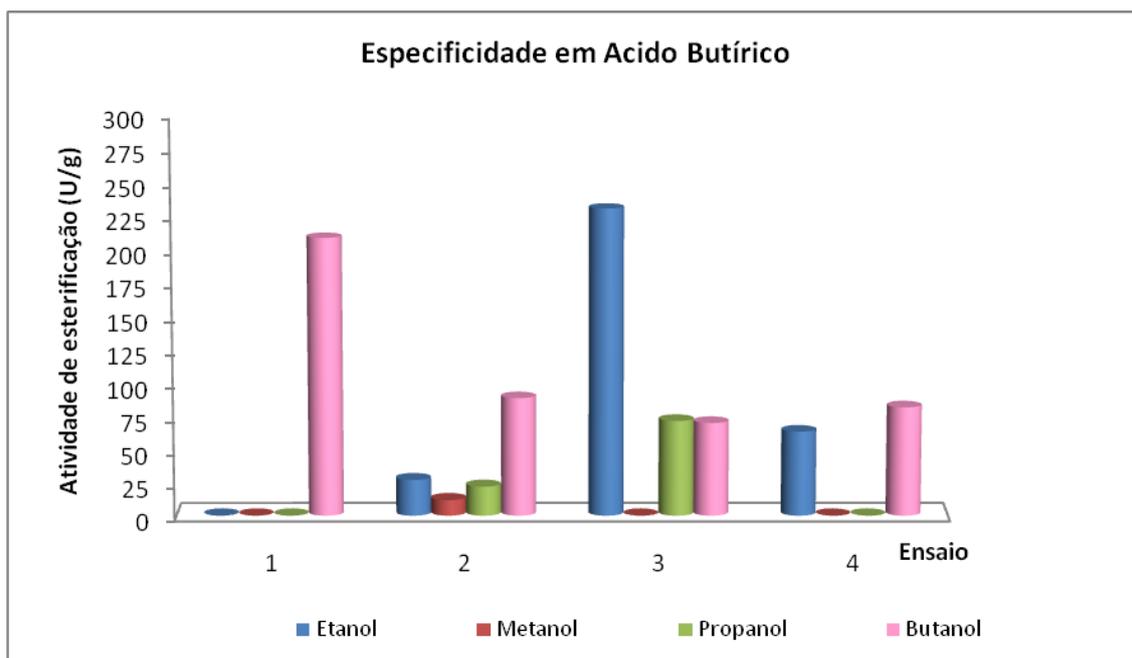


Figura 19 - Especificidade do extrato enzimático da reação do ácido butírico em diferentes alcoóis. Amostra 1 - Planejamento 5, ensaio 4 72 horas e extrato precipitado; Amostra 2 - Planejamento 5, ponto central, 72 horas e extrato bruto; Amostra 3 - Planejamento 6, ponto central, 96 horas e extrato bruto e Amostra 4 - Planejamento 6, ponto central, 96 horas e extrato precipitado.

Pela Figura 19 nota-se que a enzima do ensaio 1 apresenta maior afinidade, quando o ácido graxo utilizado na reação de esterificação é de cadeia curta na presença de um álcool de cadeia longa com baixa quantidade de água, comportamento análogo ao da enzima do ensaio 3 obtida da fermentação em farelo de mamona, que obteve sua maior atividade de esterificação quando o álcool usado na reação foi de cadeia curta.

A estabilidade de lipases bacterianas ou fúngicas em solventes orgânicos hidrofílicos é uma característica rara, e ativação da enzima por estes solventes, como

verificado para a lipase de *B. megaterium*, é mais rara ainda. A lipase de *P. mendocina* PK12CS (Jinwal *et al.*, 2003) é o único exemplo de uma lipase microbiana que é razoavelmente estável em solventes hidrofílicos, quando incubada por 2,5 h em 100% de etanol a atividade residual foi de 83%.

Contudo, cabe ressaltar que em 3 ensaios ocorreu completa inativação do extrato enzimático. Esse comportamento foi observado por Chulalaksananukul *et al.* (2003), quando utilizaram excesso de n- butanol para síntese de butirato de etila, verificando que um excesso de álcool pode agir como um inibidor competitivo na reação de esterificação, impedindo a formação do complexo enzima-ácido.

A Figura 20 mostra o comportamento da lipase na reação de ácido láurico com etanol, metanol, propanol e butanol.

Com o comportamento mostrado pela enzima do ensaio 2 fica evidente sua preferência por ácidos graxos de cadeia semelhante ao substrato no qual foi cultivada (ácido láurico (C12) e torta de babaçu (C12)) e sua afinidade com álcool de cadeia longa (Figura 20).

Rua e Ballesteros (1994) ressaltam que a diferença de atividade obtida por uma mesma lipase em meios reacionais diferentes pode estar relacionada com o número de moléculas da enzima presente no meio reacional. Ainda Bartolini *et al.* (1995) descrevem que em sua estrutura a lipase pode possuir mecanismos capazes de promover sua adaptação em diferentes ambientes reacionais com diferentes tipos de substratos, conseguindo assim atividade em diferentes meios reacionais.

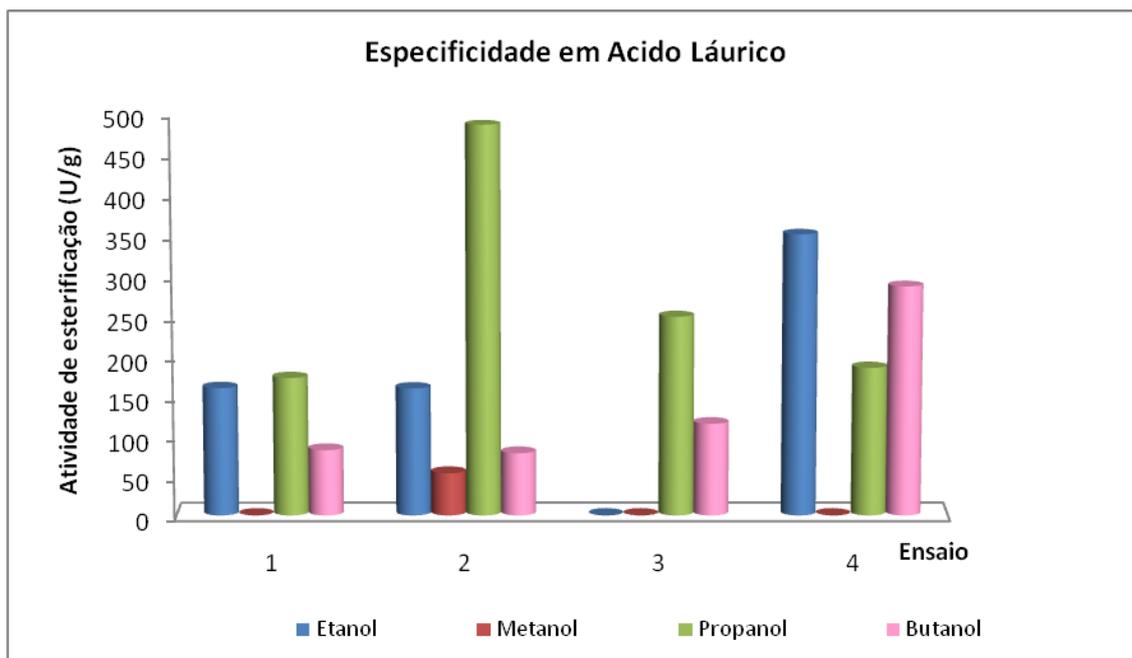


Figura 20 - Especificidade do extrato enzimático na reação do ácido láurico em diferentes alcoóis. Amostra 1 - Planejamento 5, ensaio 4 72 horas e extrato precipitado; Amostra 2 - Planejamento 5, ponto central, 72 horas e extrato bruto; Amostra 3 - Planejamento 6, ponto central, 96 horas e extrato bruto e Amostra 4 - Planejamento 6, ponto central, 96 horas e extrato precipitado.

Assim, fica claro que a reação de esterificação é dependente diretamente da concentração das lipases presentes em cada extrato. Conseqüentemente, a presença de isoenzimas contidas naturalmente em biocatalisadores brutos, enzimas hidrolíticas e misturas complexas de isoenzimas podem estar presentes em algumas lipases adquiridas comercialmente. Contudo, a reprodução dos resultados obtidos em cada estudo de processo, de forma satisfatória é necessário, buscando indicação segura do biocatalisador adequado, através de procedimentos analíticos (Maria *et al.*, 2002; Maria e Sinisterra, 1999).

Especificidade do extrato enzimático a diferentes triglicerídeos

Estudos recentes (Pencreac'h e Baratti, 2001), comparando a atividade de 32 lipases comerciais em meio aquoso e em meio orgânico, demonstraram que não há uma relação fixa entre as atividades lipolíticas nos dois meios, ou seja, não há como prever a atividade de uma enzima em meio orgânico baseando-se em sua atividade em meio aquoso. Estes resultados ressaltam a importância de se estudar a capacidade catalítica de lipases diretamente em meio orgânico e assim avaliar o potencial de aplicação destas enzimas em biocatálise.

A Figura 21 apresenta a especificidade do extrato enzimático obtido neste trabalho frente a diferentes triglicerídeos.

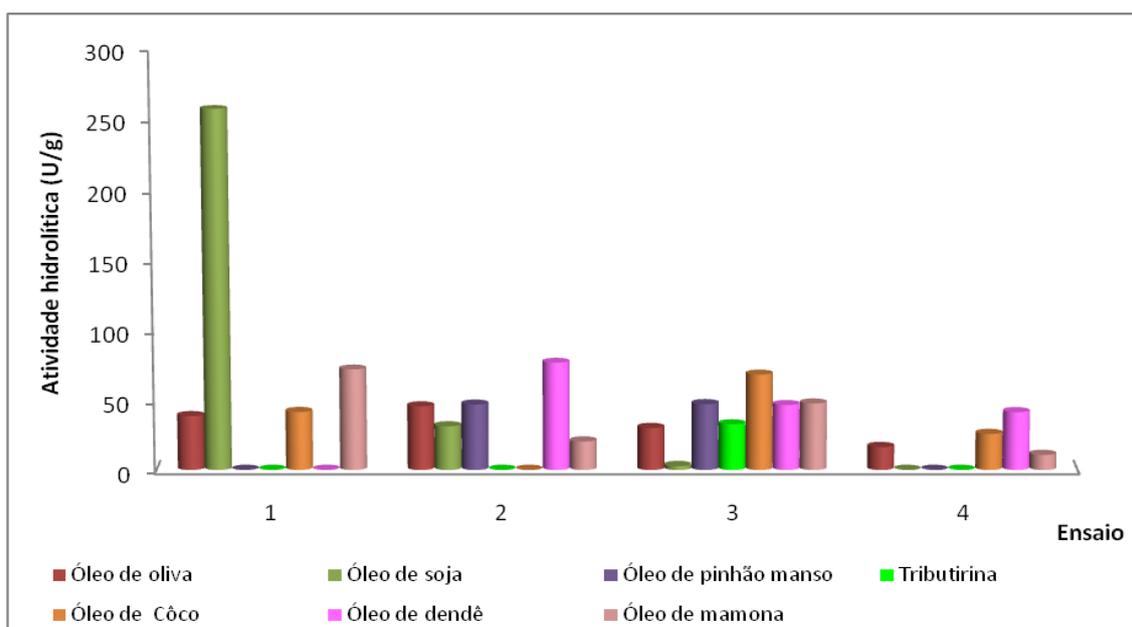


Figura 21 - Especificidade do extrato enzimático na reação com diferentes triglicerídeos. Amostra 1 - Planejamento 5, ensaio 4 72 horas e extrato precipitado; Amostra 2 - Planejamento 5, ponto central, 72 horas e extrato bruto; Amostra 3 - Planejamento 6, ponto central, 96 horas e extrato bruto e Amostra 4 - Planejamento 6, ponto central, 96 horas e extrato precipitado.

A preferência pelo óleo de soja no ensaio 1 era um comportamento esperado já que foi utilizada como fonte de suplemento na etapa de produção da enzima. Entretanto,

é evidenciado que as enzimas utilizadas neste estudo possuem uma preferência por triglicerídeos de cadeia média insaturados, com exceção do ensaio 2, 3 e 4 que apresentam especificidade com óleo de dendê que possui em sua composição ácido palmítico que é saturado, mostrando que as enzimas possuem capacidade de adaptação para utilizar os substratos do meio reacional, ou seja, segundo Koshland Jr. (1958), as enzimas possuem sítio ativo capaz de se moldar ao substrato.

A lipase concentrada de *Bacillus* sp. A30-1 foi mais específica a triglicerídeos de cadeia média, como a trilaurina (C12:0), seguida de tricaprilina (C10:0) (Wang *et al.*, 1995), da mesma forma a lipase extracelular *Rhizopus oryzae*, para a tricaprilina (C10:0) (Razak *et al.*, 1997). Já a lipase de *Aspergillus carneus* apresentou boas atividades em uma faixa de triglicerídeos variando de C4 a C18 (Saxena *et al.*, 2003).

A enzima alcalina *P. fluorescens* SIK WI utilizada por Lee *et al.* (1993), produzida em meio no qual o óleo de oliva era fonte de carbono, mostrou uma alta afinidade lipolítica por triglicerídeos de cadeias curtas como C6 e C8 com preferência por ésteres na posição 1 e 3. Semelhantemente, a lipase alcalina de *Penicillium expansum* apresentou preferência por triacilglicerol, mas não teve especificidade pela posição do éster (Sztajer *et al.*, 1993)

No trabalho realizado por Lee e Choo (1989), as enzimas utilizadas não apresentam atividade hidrolítica em alguns meios, isso pode ter ocorrido devido a uma desnaturação interfacial, ou seja, quebra da molécula em diversos peptídeos.

A hidrólise de p-nitrofenil por duas lipases A e B de *C. rugosa* caracterizadas por Rodendo *et al.* (1995), mostra que a lipase A apresenta maior afinidade por triglicerídeos C8 enquanto a lipase B por C12.

As lipases extracelulares produzidas pelo fungo *P. brevicompactum*, deste trabalho, apresentaram maiores atividades quando os triglicerídeos do meio reacional eram de cadeia média, caracterizando-as como verdadeiras lipase. Comportamento semelhante foi pesquisado por Gutarra *et al.* (2009) com a cepa de *P. simplicissimum* e por Jesus *et al.* (1999) com *P. restrictum*, ambos isolados de torta de babaçu que contém 45% de ácido láurico em sua composição.

Entretanto, a observação da Figura 21 permite verificar que a enzima produzida com o farelo de mamona mostrou boa afinidade com triglicerídeos de cadeia curta, embora tenha sido produzida em meio que continha a maioria de cadeias longas (C18). Segundo Leblanc *et al.* (1998), enzimas que possuem afinidade com ésteres de ácidos

graxos com cadeia curta, podem ser utilizadas para síntese de aromas. Desempenho similar foi observado no caso da *Pseudomonas fluorescens* HU380 a maior atividade foi observada quando triglicerídeo (C4:0) foi usado na reação (Kojima e Shimizu, 2003), bem como para lipase bruta de *Colletotrichum gloesporioides* (Colen *et al.*, 2006).

4.3.6 Teste preliminar de aplicação do extrato enzimático na alcoólise de óleo vegetal

Com o intuito de mostrar a utilização de lipases microbianas para produção de biodiesel, realizou-se um ensaio preliminar utilizando as condições otimizadas por Faccio (2004), cabe ressaltar que as enzimas utilizadas neste ensaio foram as que apresentaram maiores resultados de atividade de esterificação e previamente imobilizadas em solução de alginato de sódio e carvão ativado.

Os resultados obtidos para a alcoólise enzimática com óleo de soja são mostrados na Tabela 30.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 30, pode-se observar que as maiores conversões foram obtidas com a amostra 1 e 4 (15% e 6,5%) que são precipitadas, ou seja, as enzimas estão com ausência de possíveis interferentes que se liguem ao sítio ativo da enzima, fazendo com que a reação não ocorra, cabe ressaltar que as enzimas foram imobilizadas em alginato de sódio e carvão ativado.

No trabalho realizado por Rampim (2007), metanol foi mais conveniente para a realização de síntese utilizando lipases de *P. fluorescens* e *R. miehei*. A lipase de *P. fluorescens* apresentou mais de 90% de conversão para o óleo de girassol enquanto a lipase de *R. miehei* foi capaz de atingir 80% de conversão.

Luo *et al.* (2006) investigaram a enantioseletividade de uma lipase psicrotófila de *P. fluorescens* para produção de biodiesel e conseguiu uma conversão de 24,8%.

Tabela 30 – Conversões obtidas na alcoólise enzimática do óleo de soja em solvente orgânico.

Parâmetros de produção da enzima	Conversão (%)
Ensaio 4 72 horas (80%U/3%OS) ppto torta de babaçu (Amostra 1)	15,05 ± 4,85
Ponto Central 72 horas (70%U/2%OS) extrato bruto torta de babaçu (Amostra 2)	1,21 ± 1,39
Ponto Central 96 horas (70%U/2%OS) extrato bruto farelo de mamona (Amostra 3)	0,93 ± 0,11
Ponto Central 96 horas (70%U/2%OS) extrato ppto farelo de mamona (Amostra 4)	6,47 ± 2,57

Na literatura, Encimar *et al.* (2002) fizeram uso de óleo de alcachofra pra a reação de transesterificação com lipase de *Cynara cardunculus*, alcançando um rendimento máximo de 94% a 75°C.

A baixa conversão obtida nas amostras 2 e 3 pode ser devido a uma inativação que pode ser explicada pela imiscibilidade entre os triglicerídeos e alcoóis de cadeia curta (metanol e etanol). Além disso, o suporte no qual a enzima foi imobilizada pode adsorver compostos polares como etanol, o que promove a formação de uma camada estagnada desse reagente em torno da partícula de enzima imobilizada, impedindo a entrada de triglicerídeo ao sítio ativo da enzima (Chen e Wu, 2003).

Apesar de o metanol propiciar melhores rendimentos em condições mais amenas de temperatura, o contexto brasileiro sugere a utilização do etanol, devido à grande capacidade produtora no país e por esse álcool ser obtido de uma fonte renovável de energia (Silva, 2008).

A razão molar óleo:álcool é uma das variáveis mais importantes que afetam o rendimento de ésteres de ácidos graxos. Kusdiana e Saka (2001a) sugerem que razões molares mais altas de óleo:álcool resultem em uma reação de transesterificação mais eficiente, devido talvez ao aumento da área de contato entre álcool e triglicerídeos. Fato este também observado nos resultados apresentados por He *et al.* (2007); Silva *et al.* (2007); Bunyakiat *et al.* (2006) para transesterificação contínua e não-catalítica de óleos vegetais sem adição de cossolvente.

4.3.7 Caracterização do catalisador

Para a caracterização do catalisador foi utilizada somente a amostra que apresentou maior conversão na síntese de biodiesel (ensaio 4 do planejamento 5 em 72 horas, concentrado com 60% de saturação com sulfato de amônio e imobilizado com alginato de sódio e carvão ativado).

A partir das isotermas de adsorção do nitrogênio foram determinadas as seguintes propriedades do catalisador: A_{BET} (área superficial determinada pela isoterma BET); V_{BJH} (volume dos poros, determinação pelo modelo BJH); diâmetro médio do poro (determinado pelo modelo BJH).

O resultado da caracterização e alguns exemplos são apresentados na Tabela 31.

Tabela 31 – Resultado da caracterização dos catalisadores pela análise de BET

Enzima	Diâmetro de Poro (nm)	Volume de Poro (mL/g)	Área Superficial – BET (m ² /g)
Novozym 435	15,0	0,5	130
<i>P. simplicissimum</i> imobilizada (accurel)	13,0	0,14	42,6
<i>A. parasiticus</i> imobilizada (accurel)	13,0	0,14	46,3
<i>P. brevicompactum</i> imobilizada (alginato de sódio e carvão ativo)	4,24	0,1	89,8

Conforme a Tabela 31 observa-se que o diâmetro do poro da enzima obtida neste trabalho e imobilizada na solução de alginato de sódio e carvão ativado é pequeno se comparada com a enzima Novozym 435, o que explica o baixo rendimento de ésteres etílicos de óleo de soja. Como os poros são pequenos, dificulta a entrada da molécula do óleo em suas cavidades, dificultando a reação, conduzindo, assim, a um baixo rendimento. Além disso, o diâmetro pequeno dos poros aumenta a resistência de transferência de massa devido à difusão e, conseqüentemente, aumenta o tempo reacional.

4 Resultados e Discussões

Contudo a capacidade de adsorção dos poros da enzima de *P. brevicompactum* é semelhante à enzima de *P. simplicissimum* e *P. parasiticus* ambas, imobilizadas em accurel.

5 CONCLUSÕES

Após a realização deste estudo pode-se concluir que:

- ✘ É possível realizar fermentação em estado sólido para produção de lipases com atividade de esterificação e hidrolítica usando farelo de mamona e torta de babaçu. O estudo da suplementação realizado com os micro-organismos, ambos do gênero *Penicillium*, se mostram promissores na produção de lipase sendo a suplementação com óleo de soja a que resultou em melhores atividades.
- ✘ A técnica de planejamento de experimento mostrou-se eficiente para maximização de processo fermentativo com:
 - ✘ Extrato bruto obtido da FES de *P. brevicompactum* em torta de babaçu
 - Para a atividade hidrolítica a condição maximizada foi em 96 horas de fermentação (47,4 U/g), 30°C, 70% de umidade e suplementação com 2% de óleo de soja;
 - Para a atividade de esterificação a condição maximizada foi em 72 horas de fermentação (244,17 U/g), 30°C, 70% de umidade e suplementação de 2% de óleo de soja;
 - ✘ Para o extrato concentrado, com 60% de saturação com sulfato de amônio, obtido da FES de *P. brevicompactum* em torta de babaçu
 - O ponto de maior atividade hidrolítica do extrato enzimático concentrado ocorrem em 72 horas de fermentação (227,57 U/g), 30°C, 70% de umidade e suplementado com 0,6% de óleo de soja;
 - O ponto com maior atividade de esterificação foi em 72 horas de fermentação (207,40 U/g), 30°C, 80% de umidade e meio suplementado com 3% de óleo de soja;
 - ✘ Para o extrato enzimático bruto obtido da FES de *P. brevicompactum* em farelo de mamona

- A atividade hidrolítica foi maximizada em 96 horas de fermentação (87,6 U/g), 30°C, 70% de umidade e meio suplementado com 2% de óleo de soja;
- A atividade de esterificação maximizada foi conseguida em 96 horas (128,96 U/g) nas condições: 30°C, 70% de umidade e meio suplementado com 2% de óleo de soja;
- ✗ Para o extrato concentrado, com 60% de saturação com sulfato de amônio, obtido da FES de *P. brevicompactum* em farelo de mamona:
 - Para a atividade hidrolítica não foi possível se obter uma condição maximizada, porém, valores promissores foram conseguidos em 96 horas de fermentação (128,26 U/g) na condição 30°C, 80% de umidade e meio suplementado com 1% de óleo de soja;
 - A condição maximizada para produção de lipase com atividade de esterificação foi em 96 horas (111,30 U/g) na condição de 70% de umidade, meio suplementado com 2% de óleo de soja a 30°C;
- ✗ No estudo realizado para FES de *P. verrucosum* em torta de babaçu e farelo de mamona as atividades de hidrólise e de esterificação foram inferiores as obtidas no estudo com *P. brevicompactum*, optando-se por interromper o estudo;
- ✗ A maior atividade de esterificação específica obtida foi com o extrato concentrado de *P. brevicompactum* e farelo de babaçu (149,90 U/mg), isso se deve a pré-purificação do extrato com sulfato de amônio que concentra as proteínas de interesse;
- ✗ Para os testes de imobilização do extrato enzimático, realizados com os melhores resultados de atividade hidrolítica e de esterificação, a solução de alginato de sódio e carvão ativado apresentou os melhores resultados;
- ✗ Estabilidade a baixas temperaturas
 - ✗ Extrato enzimático bruto obtido da FES de *P. brevicompactum* em torta de babaçu

- Com o extrato mantido a -10°C a maior atividade hidrolítica foi obtida em 76 dias (96,51 U/g) e a atividade de esterificação em 10 dias (228,54 U/g);
 - Com o extrato mantido a 4°C , a maior atividade hidrolítica foi obtida em 10 dias (94,83 U/g) e a atividade de esterificação em 30 dias (163,47 U/g);
- ✘ Extrato enzimático concentrado obtido da FES de *P. brevicompactum* em torta de babaçu
- Com o extrato mantido a -10°C a maior atividade hidrolítica foi obtida em 76 dias (125,5 U/g) e a atividade de esterificação em 76 dias (200,90 U/g);
 - Com o extrato mantido a 4°C , a maior atividade hidrolítica foi obtida em 10 dias (35,3 U/g) e a atividade de esterificação em 20 dias (150,07 U/g);
- ✘ Extrato enzimático bruto obtido da FES de *P. brevicompactum* em farelo de mamona
- Com o extrato mantido a -10°C a maior atividade hidrolítica foi obtida em 76 dias (96,54 U/g) e a atividade de esterificação em 10 dias (268,50 U/g);
 - Com o extrato mantido a 4°C , a maior atividade hidrolítica foi obtida em 10 dias (58,23 U/g) e a atividade de esterificação em 30 dias (207,00 U/g);
- ✘ Extrato enzimático concentrado obtido da FES de *P. brevicompactum* em farelo de mamona
- Com o extrato mantido a -10°C a maior atividade hidrolítica foi obtida em 40 dias (52,10 U/g) e a atividade de esterificação em 20 dias (251,15 U/g);
 - Com o extrato mantido a 4°C , a maior atividade hidrolítica foi obtida em 10 dias (71,01 U/g) e a atividade de esterificação em 86 dias (96,74 U/g);

✘ Especificidade

- ✘ Extrato enzimático bruto obtido da FES de *P. brevicompactum* em torta de babaçu
 - Para a atividade de esterificação possui maior especificidade por alcoóis de cadeia longa e ácidos graxos de cadeia média;
 - Para atividade hidrolítica possui maior especificidade por triglicerídeos de cadeia média insaturada;
- ✘ Extrato enzimático concentrado obtido da FES de *P. brevicompactum* em torta de babaçu
 - Para a atividade de esterificação possui maior especificidade por alcoóis de cadeia longa e ácidos graxos de cadeia média;
 - Para atividade hidrolítica possui maior especificidade por triglicerídeos de cadeia média insaturada;
- ✘ Extrato enzimático bruto obtido da FES de *P. brevicompactum* em farelo de mamona
 - Para a atividade de esterificação possui maior especificidade por alcoóis de cadeia curta e ácidos graxos de cadeia curta;
 - Para atividade hidrolítica possui maior especificidade por triglicerídeos de cadeia média insaturada;
- ✘ Extrato enzimático concentrado obtido da FES de *P. brevicompactum* em farelo de mamona
 - Para a atividade de esterificação possui maior especificidade por alcoóis de cadeia curta e ácidos graxo de cadeia curta;
 - Para atividade hidrolítica possui maior especificidade por triglicerídeos de cadeia média insaturada;
- ✘ Para o teste preliminar da reação de alcoólise enzimática com óleo vegetal de soja a enzima concentrada e imobilizada obtida da FES de *P. brevicompactum* e torta de babaçu, apresentou a melhor conversão 15,05%.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✘ Realizar novo estudo para FES em torta de babaçu e farelo de mamona com *P. verrucosum*, a fim de se obter condições experimentais mais promissoras;
- ✘ Desenvolver estudo de concentração do extrato enzimático obtido da FES em torta de babaçu e *P. brevicompactum* a fim de se obter condições de maximização nas atividades de hidrólise e esterificação;
- ✘ Novo estudo de concentração para o extrato obtido da FES em farelo de mamona e *P. brevicompactum* para maximizar as atividades hidrolíticas;
- ✘ Testar novos métodos de purificação com o objetivo de se obter enzimas com maior poder catalítico;
- ✘ Estudo com novos suportes para imobilização;
- ✘ Testar novos parâmetros e óleos vegetais para reação de alcoólise a fim de aumentar as conversões;
- ✘ Testar o aumento de escala na FES com as condições maximizadas neste trabalho;
- ✘ Testar extração da enzima em diferentes pH;
- ✘ Testar a estabilidade da enzima a altas temperaturas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas H., Hiol A., Deyris V., Comeau L.; **Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp strain isolated from palm fruit.** Enzyme and Microbial Technology, 2002: v.31: 968-975.
- Aguilar C.N, Augur C., Favela- Torres E, Viniegra – González G.; **Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose end tannic acid.** Journal of Ind. Microbiology & Biotechnology 2001:26:296-302
- Agrawal D., Patidar P., Banerjee T., Patil S.; **Production by *Penicillium* sp. Under SSF conditions and its applications soy protein hydrolysis.** Process biochemistry, 2004:34:977-981.
- Akhtar M.W., Mirza A.Q., Chughtai, M.I.D.; **Lipase induction in *Mucor hiemalis*.** Applied and Environmental Microbiology, 1980:v. 40, n. 2, p. 267-273.
- Alonso, F.O.M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682).** Rio de Janeiro: 2001. Dissertação de mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro
- Arroyo M, Sanchez-Montero J.M., Sinisterra J.V.; **Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: effect of water activity on enzymatic activity in organic media.** Enzyme Microb Technol 1999; 24: 3–12.
- Asano Y., Fukuda Y.S., Tanaka A., Ueda M.; **Biofuel production process by novel biocatalysts.** Journal of Molecular Catalysis – B:Enzymatic, 2002: v.17:111.
- Asther M., Haon M., Roussos S., Record E., Delattre M., Meessen-Lesage L., Labat M. ; **Feruloyl esterase from *Aspergillus niger* a comparison of the**

- production in solid state and submerged fermentation.** Process Biochemistry, 2002: 38: 685-691.
- Azeredo, L.A.I., Gomes, P.M., Sant'Anna Jr, G., Castilho, L.R., Freire, D.M.G., . **Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations.** Current Microbiology, 2007: 54: 361-365.
 - Bacha A.B., Gargouri Y., Ali Y.B., Miled N., Reinbolt J., Mejdoub H.; **Purification and biochemical characterization of ostrich pancreatic lipase.** Enzyme and Microbial Technology, 2005: v.37: 309-317.
 - Barros Neto B., Scarmínio I.S., Bruns R.E., **Planejamento e otimização de experimentos.** Campinas :Unicamp, 1996.
 - Bastida A., Sabuquillo P., Armisen P., Fernandez-Lafuente R., Huguet J., Guisán J.M.; **A single step purification, immobilization and hyperactivation of lipase via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports.** Biotechnology and Bioengineering, 1998:v.58:486-493.
 - Benjamin S., Pandey A., **Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation.** Biology and Technology., 2000: 43, p. 453-460.
 - Bernardes O.L., Bevilaqua J.V., Leal M.C.M.R., Freire, D.M.G., Lagnone, M.A.P.; **Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase.** Applied Biochemistry and Biotechnology, 2007:136-140, 105-114.
 - Bertolini M.C., Schrag J.D., Cygler M., Thomas D.Y., Vernet T.; **Expression in yeast, characterization and comparison of lipases from *Geotrichum candidum*.** Eur. J. Biochem., 1995.
 - Betancor L., Gallego F.L., Hidalgo A., Alonso-Morales N., Dellamora-Ortiz G., Mateo C., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M.; **Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions.** Enzyme Microb Technol 2006; 39(4):877-82.

- Bianchi V.L.D., Moraes I.O., Capalbo D.M.F. **Fermentação em estado sólido, Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**, 1ª edição, Ed. Edgard Blücher Ltda, 2001, v.2, p.247-276.
- Bilanicová D., Salis A., Ninham B.W., Monduzzi M.; **Specific anion effects activity in nonaqueous media**. J. Phys. Chem. B., 2008: 112: 12066-12072.
- Bligh, E. C.; Dyer, W.J. **A rapid method of total lipid. Extraction and purification**. Can. J. Biochem. Physiol., 1959:37:911-917.
- Borzani W., Lima U. A., Aquarone E., Schmidell W.; **Processos Fermentativos e Enzimáticos – Biotecnologia Industrial**, 1ª edição. Editora Edgard Blücher, 2001:v.3:377 -378.
- Bradoo S., Rathi P., Saxena R.K., Gupta R.; **Microwave-assisted rapid characterization of lipase selectivities**. Journal of Biochemistry, 2002:51:115-120.
- Bradford, M.M.; **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-drye binding**. Anal. Biochemistry, 1976:v.72:248-254.
- Brígida A.I.S., **Estudo da imobilização de lipase tipo B de cândida Antarctica utilizando fibra da casca de coco verde como suporte**. Fortaleza: 2006. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará.
- Bryjak J., Trochimczuk A.W.; **Immobilization of penicillim acylase on hydrophobic acrylic carriers**. Enzyme and Microbial Technology, 2006: v. 39:n. 4:573-578.
- Bunyakiat K., Makmee S., Sawangkeaw R., Ngamprasertsith S.; **Continuous production of biodiesel via transesterification from Vegetable Oils in supercritical methanol**. Energy & Fuels, 2006: v.20: 812-817.
- Burkert, J.F. de M. **Otimização das Condições de Produção da Lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552**. Campinas: 2002. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

- Burkert J.F.M., Maugeri F., Rodrigues M.I.; **Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design.** Bioresource Technology, 2004: vol 91, p.77-84.
- Burkert J.F.M., Maldonado R.R., Maugeri F., Rodrigues M.I. **Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2005, v.80, 61-67.
- Cardenas F., Alvarez E., Castro-Alvarez M.S., Sanchez-Montero J.M., Valmaseda M., Élson S.W., Sinisterra J.V.; **Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases.** J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2001:14:111-123.
- Carvalho P.O., Calafatti S.A., Marassi M., Silva D.M., Contesini F.J., Bizaco R.; **Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas.** Química Nova, 2005:28:614-621.
- Carvalho P.O., Campos P.R.B., Noffs M.A., Oliveira J.G., Shimazu M.T., Silva D.M.; **Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados.** Química Nova, 2003:v.26.
- Carvalho N.B., Souza R.L., Castro H.F. Zanin G.M., Lima A.S., Soares C.M.F.; **Sequential Production of Amylolytic and Lipolytic Enzymes by Bacterium Strain Isolated from Petroleum Contaminated Soil.** Appl. Biochem. Biotechnol, 2008:150: 25-32.
- Castilho L.R., Polato C.M.S., Buarque E.A., Sant'Anna Jr. G.L., Freire D.M.G.; **Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state submerged fermentations.** Biochem. Eng. J., 2000: 4: 239-247.
- Castro H.F., Mendes A.A., Santos J.C., Aguiar C.L.; **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação.** Química Nova, 2004:v.27:n.1.
- Cavalcanti E.A.C., Gutarra M.L.E., Freire D.M.G., Castilho L.R., Sant'Anna G.L.; **Lipase production by solid-state fermentation in Fixed-Bed bioreactors.** Brazilian Archives of Biology and Technology, 2005:48:79-84.

- Chen J., Wu W.; **Regeneration of Immobilized *Candida antarctica* Lipase for Transesterification**. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003:v.95:466-469.
- Chen H.Z., Xu J., Li Z.H.; **Temperature control at different bed depths in a novel solid-state fermentation system with two dynamic changes of air**. Biochem. Engineering Journal, 2005: 23:117-122.
- Chen C.S., Sih C.J.; **General aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvent**. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.,1989:28: 695–707.
- Chinn M.s., Nokes S.E., Strobel H.J.; **Influence of moisture content and cultivation duration on *Clostridium thermocellum* 27405 end- product formation in solid substrate cultivation on Avicel**. Bioresource Technology,2008: 99, 2664-2671.
- Christen P., Angeles N. Farres A., Revah S.; **Lipase production by *Rhizopus delemar* grown on a synthesis support in solid fermentation**. Proceedings of the 2nd International Symposium on Solid State Fermentation, Kluwer Academic Publishers, 1997.
- Chulalaksananukul W., Condoret J.S., Combes D.; **Geranyl acetate synthesis by lipase catalized transesterification in super critical carbon dioxide**. Enzyme Microbiology Technology, 2003:15:691.
- Colen G., Junqueira R.G., Moraes-Santos T.; **Isolation and screening alkaline lipase-production fungi from Brazil soil**. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2006: v.22:881-885.
- Cordova J., Nemmaoui M., Ismaïli-Alaoui M., Morin A., Roussos S., Raimbault M., Benjilali B.; **Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,1998:v.5:75-78.
- Costa M. A.; Peralta R. M. **Production of lipase by soil fung and partial characterization of lipase from a selected strain (*Penicillium wortmanii*)**. J. basic microbial.,1999:v.39:11-15.

- Corzo G., Revah S.; **Production and characteristics of the lipases from *Yarrowia lipolytica* 681.** *Biores. Technol.*,1999: v.70:173-180.
- Couto S.R., Sanromán M.A.; **Application of solid-state fermentation to food industry-A review.** *Journal of Food Engineering*, 2005:76: 291-302.
- Dai D. Xia L.; **Enhanced Production of *Penicillium expansum* PED-03 Lipase through Control of Culture Conditions and Application of the Crude Enzyme in Kinetic Resolution of Racemic Allethrolone.** *Biotechnol. Prog.*, 2005:v.21:1165-1168.
- Dalla Rosa C.; **Produção de ésteres etílicos a partir de óleo de soja utilizando lipase em propano.** Dissertação de M. Sc., Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2006.
- Dalla-Vecchia R., Nascimento M. G., Soldi V. **Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros.** *Química Nova*, 2004:v.27: n.4.
- 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.
- Damaso M.C.T., Passianoto M.A., Freitas S.C., Freire DMG., Lago R.C.A., Couri S.; **Utilization of Agroindustrial Residues for Lipase production by Solid-State Fermentation.** *Brazilian Journal of Microbiology*, 2008:39: 676-681.
- Darnoko D., Cheryan M.; **Kinetics of palm oil: Trasterification in a Batch Reactor.** *JAACS*, 2000:v.77:1263-1266.
- De Carli I.C.; **Síntese de ésteres derivados de carboidratos com propriedades surfactantes utilizando lipases imobilizadas em suporte sólido.** Blumenau, 2006. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Naturais. Universidade Regional de Blumenau – FURB.
- Deive F.J., Costas M., Longo M.A.; **Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus*.** *Biotechnol. Lett.*, 2003:v.25:1403-1406.

- Demirbas A.; **Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey.** *Energy Conversion and Management*, 2003:v.44: 2093 – 2109.
- Diaz J.C., Rodriguez 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*, 2006:39:1042-1050.
- Di Luccio M., Capra F., Ribeiro N.P., Vargas G.D.L.P., Freire D.M.G., Oliveira D.; **Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2004:113-116, 173-180.
- Dominguez A., Costas M., Longo, M.A., Sanromán A.; **A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*.** *Biotechnology Letters*, 2003:25:1225-1229.
- Dörmo N., Bélafi-Bakó K., Bartha L., Ehrenstein U., Gubicza L.; **Manufacture of an environmental safe biolubrificant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system.** *Biochemical Engineering Journal*, 2004:v.21:n.3:229-234.
- Draget K. I., Skjak-Braek G., Smidsrod O., **Alginate based new materials.** *International Journal of Biological Macromolecules*, Norway,1997: v.21:47-55.
- Dutra J.C.V., Terzi S.C., Bevilaqua J.V., Damaso M.C.T., Couri S., Langone M.A.P., Senna L.F.; **Lipase Production in solid-state fermentation monitoring biomass growth of *Aspergillus niger* using digital image processing.** *Applied Biochemistry Biotechnology*, 2008:147:63-75.
- Dziezak J.D.; **Enzymes: catalyses for food processes.** *Food Technology*, 1991:v.45:78-85.

- Ellaiah P., Prabhakar T.T. , Ramakrishna B., Thaer Taleb A., Adinarayana K.; **Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger***. Process Biochemistry, 2004:v.39: 525-528.
- Encimar J.M.; **Biodiesel fuels from vegetable oils: transesterification of *Cynara cardunculus L.* oils with ethanol**. *Energy & Fuels*,2002:v. 16:443-450.
- Ertugrul S., Dönmez G., Takaç S.; **Isolation of lipase producing *Bacillus sp.* from olive mill wastewater and improving its enzyme activity**. Journal of Hazardous Materials, 2007:149:720-724.
- Essamri M., Deyris V., Comeau L.; **Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents**. J. of Biotechnol., 1998:v.60:97-103.
- Faccio C.; **Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais**. Dissertação de M. Sc., Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2004.
- Falony G., Armas G.C., Mendosa J.C.D., Hernández J.L.M.; **Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation**. Food Technol. Biotechnol, 2006:v.44: 235 – 240.
- Faber K.; **Biotransformations in organic chemistry**. 3. Ed. Berlin : Springer Verlag, 1997:160-187.
- 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, 2007:44:8-13.
- Ferreira J. P.M.; **Segredos da catálise enzimática**. Ensino em Biotecnologia. Boletim as Sociedade Portuguesa de Biotecnologia, 2002:n.72:22-29.
- Fickers P., Nicaud J.M., Destain J., Thonart P.; **Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in yeast *Yarrowia lipolytica***. Journal of Applied Microbiology, 2004:v.96:742-749.

- Fickers P., Ongena M., Destain J., Weekers F., Thonart P.; **Production and down-stream processing an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica***. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006:v.38:756-759.
- Foresti M.L., Ferreira M.L.; **Chitosan-immobilized for the catalysis of fatty acid esterifications**. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007:40:769-777.
- Freedman B., Butterfield R.O., Pryde E.H.; **Transesterification kinetics of soybean oil**. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1986: v.63:1375-1380.
- Freire D.M.G.; **Seleção de micro-organismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum***. Rio de Janeiro: 1996. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica, IQ/UFRJ.
- Freire D.M.G., Gomes P.M., Bon E.P.S., Lippel Sant'Anna Jr. G.L.; **Lipase production by a new promising strain *Penicillium restrictum***. *Revista de Microbiologia, São Paulo*, 1997:v.28:n.1:6-12.
- Freire D.M., Teles E.M.F., Bon E.P.S., Lippel San't Anna G.; **Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter: Effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1997^a: v.63-65:409-421.
- Freire D.M.G., Castilho L.R.; **Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido**. *Ver. Bras. Farm.*, 2000:v.81:48-56.
- Fungaro M.H.P., Maccheroni Jr.; **Recursos genéticos e melhoramento – Melhoramento genético para a produção de enzimas aplicadas à indústria de alimentos**. 1ª impressão, Embrapa, São Paulo:2002:427-453.
- Fukuda H., Kondo A., Noda H.; **Biodiesel fuel production by transesterification of oils**. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001:v.92:n.5:405–416.
- Gandhi N.N.; **Application of lipase**. *Journal of the American Oil Chemists' Societ*, 1997:v.74:621-634.
- Garcia T., Coteron A., Martinez M., Aracil J.; **Kinetic model for the esterification of oleic acid and cetyl alcohol using an immobilized lipase as catalyst**. *Chemical Engineering Science*, 2000:55:1411-1423.

- Germano S., Lima V.M.G., Soccol C.R., Pontarollo R., Fontana J.D., Krieger N., **Protease production by *Penicillium citrinum* in solid state fermentation**, in: Advances in Biotechnology, Educational Publishers and Distributors, New Delhi, 1998, pp. 59–66.
- Germano S.; **Desenvolvimento de bioprocessos para a produção, caracterização e purificação de proteases de *Penicillium* sp. Por fermentação no estado sólido**. Curitiba: 2000. Tese de Doutorado. Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, UFPR.
- Germano S., Pandey A., Osaku C.A., Rocha S.N., Soccol C.R.; **Characterization and Stability of protease from *Penicillium* sp. Produced by solid state fermentation**. Enz. And Microbial Technol., 2003:v.32:246-251.
- Gervais, P. e Molin, P.; **The role in solid-state fermentation**. *Biochemical Engineering Journal*, 2003:13:85-101.
- Ginalska G., Bancercz R., Kornilowicz-Kowaslka T.; **A thermostable lipase produced by a newly isolated *Geotrichum*-like strain R-59**. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2004:v.31:177-182.
- Gitlesen T., Bauer M., Adlercreutz P.; **Adsorption of lipase on polypropylene powder**. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997:v.1345:188-196.
- Godoy, M.G., Gutarra M.L.E., Maciel, F.M., Felix, S.P., Bevilaqua, J.B., Machado, O.L.T., Freire, D.M.G.; **Use of a low-cost methodology for biodetoxification of castor bean waste and lipase production**, *Enzyme and Microbial Technology*, 2009:44:317-322.
- 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*, 1999:v.35:85-90.
- Gonçalves F.A.G., **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**. Belo Horizonte 2007. Dissertação de Mestrado. Depto. de Ciências de Alimentos da Universidade Federal de Minas Gerais.
- Gupta, M.N.; **Enzyme function in organic solvents**. *Eur. J. Biochem.*, 1992:203,25-32.

- Gupta, R., Gupta, N., Rathi P.; **Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties.** *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004:v.64:763–781.
- Gupta M.N., Roy I.; **Enzyme in organic media: Forms, functions and applications.** *European Journal of Biochemistry*, 2004:v.271:2575-2583.
- Gutarra, M.L.E., Cavalcanti, E.D.C., Castilho, L.R., Freire, D.M.G.; **Lipase Production by solid-state fermentation.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2005:121-124:105-116.
- Gutarra, M.L.E., 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.** *J. of Chemical Technology & Biotechnology*, 2007:v.82:313-318.
- Gutarra M.L.E., Godoy M.G., Maugeri F. Rodrigues M.I., Freire D.M.G., Castilho L.R.; **Production an acidic and Thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation.** *Bioresource Technology*, 2009:100:5249-5254.
- Hasan, F., Shah, A.A., Hamee A.; **Industrial applications of microbial lipases.** *Enzyme and Microbial Technology*, 2006:39:235-251.
- Hatzinikolaou D.G., Macris J.B., Christakopoulos P., Kekos D., Kolisis F.N., Fountoukidis C.; **Production and parcial characterization of lipase from *Aspergillus niger*.** *Biotechnol Lett* 18 (5): 1996:547-552.
- Hazarika, S., Goswami, P., Dutta, N.N., Hazarika, A.K.; **Ethyl oleate synthesis by Porcine pancreatic lipase in organic solvents.** *Chem Eng Journal*, 2002:85:61-68.
- 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.
- He, H., Tao W., Zhu, S.; **Continuons production of biodiesel from vegetable oil using supercritical methanol process.** *Fuel*, 2007:v.86:442-447.

- Hegedus D.D., Khachatourians G.G.; **Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana***. *Biotechnology Letters*, 1988:v.10:637-642.
- Herbert R.A.; **A perspective on the biotechnological potential of extremophiles**. *Trends Biotechnol.*, 1992:10:395–402.
- Hilal N., Kochkodan V., Nigmatullin R., Goncharuk V., Al-Khatib L.; **Lipase immobilized biocatalytic membranes for enzymatic esterification: comparison of various approaches to membrane preparation**. *J. Membr. Sci.*, 2006:268:198–207
- Hiol A., Jonzo M.D., Rugani N., Druet D., Sarda L., Comeau L.C.; **Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit**. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000:v.26:421-430.
- Holker, U., Hofer, M., Lenz, J; **Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi**. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 2004:64:175-186.
- Holker, U. e Lenz, J.; **Solid-state fermentation are there any biotechnological advantages**. *Current Opinion in Microbiology*, 2005:8: 301-306.
- Imahara H., Minami E., Hari S., Saka S.; **Thermal stability of biodiesel in supercritical methanol**. *Fuel*, v.87, pp.1-6, 2007.
- Jacobsen T., Olsen J., Allermann K.; **Production, partial purification and immunochemical characterization of multiple forms of lipase from *Geotrichum candidum***. *Enzyme and Microbial Technology*, 1989:v.11:n.2:90-95.
- Jaeger K.E., Ransak S., Koch H.B., Ferrato F., Dijkstra B.W.; **Bacterial lipase**. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1994:v.15:29-63.
- Jaeger K.E., Reetz M.T.; **Microbial lipases form versatile tools for biotechnology**. *Tibtech*, 1998:16:396-403.
- Jaeger K.E; Eggert T. **Lipases for biotechnology**. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002:v.13:390 – 397.
- Jesus M.F.C.P., Branco R.N., Sant’Anna Jr. G.L., Freire D.M.G., Silva Jr. J.G.; ***Penicillium restrictum* lipases: a comparative study and characterization of**

- enzymes with different degrees of purity.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 1999:v.16:n.2:113-118.
- Jinwal U.K., Roy U., Chowdhury A.R., Bhaduri A.P., Roy P.K.; **Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Pseudomonas mendocina* PK-12CS and chemoselective hydrolysis of fatty acid ester.** *Bioorg. Med. Chem.*, 2003:v.11:1041-1046.
 - João J.J.; **Estudos de reações de transesterificação com lipases imobilizadas e determinação de coeficiente de difusão de ésteres em organo-gel.** Florianópolis: 1999. Tese de Doutorado – Faculdade de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
 - Joseph B., Ramteke P.W., Thomas G.; **Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments.** *Biotechnology Advances*, 2008:26:457-470.
 - Kademi A., Ait-Abdelkader N., Fakhreddine L., Baratti J.C.; **Characterization of a new thermostable esterase from the moderate thermophilic bacterium *Bacillus circulans*.** *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2000:v.10:395-401.
 - Kaewthong W., Sirisansaneeyakul S., Prasertsan P., H-Kittikun A.; **Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase.** *Process Biochemistry*, 2005:v.40:1525-1530.
 - Kamini N.R., Mala J.G.S., Puvanakrishnan R.; **Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake.** *Process Biochemistry*, 1998:33:505-511.
 - Kanwar, L.; Kumar, B.; Goswami, P.; **Production of a *Pseudomonas* in n-alkane substrate and its isolation using and improved ammonium sulfate precipitation technique.** *Bioresource Technology*, 2002: v.84: 207-211, 2002.
 - Kanwar S.S., Ghazi I.A., Chimni S.S., Joshi G.K., Rao G.V., Kaushal R.K., Gupta R., Punj V.; **Purification and properties of a novel extra-cellular thermotolerant metalloproteinase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375 isolate.** *Protein Expression & Purification*, 2006:46:421-428.
 - Karadzic I., Masui A., Zivkovic L.I., Fujiwara N.; **Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa***

- isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid.** Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006:102,82-89.
- Kemeny D.M., Challacombe S.J.; In: **Elisa and other solid phase immunoassays.** New York, John Wiley & Sons Ltda, 1988.
 - 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 Biosyst. Engineering, 2008:31:119-125.
 - Kennedy J.F., White C.A., Melo E.H.M.; **The immobilization of enzymes and cells.** Chimicaoggi, 1988:21-29.
 - Knezevic Z., Bobic S., Milutinovic A., Obradovic B., Mojovic L., Bugarski B.; **Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in leithin/isooctane system.** *Process Biochemistry*, 2002:v.38:313-318.
 - Kiran G.S., Shanmughapriya S., Jayalakshmi J., Selvin J., Gandhimathi R., Sivaramakrishnan S., Arunkumar M., Thangavelu T., Natarajaseenivasan K.; **Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057).** Bioprocess Biosyst. Eng, 2008:31:83-492.
 - Ko W.H, Wang I.T., Ann P.J., **A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils.** Soil Biology and Biochemistry, 2005:37:597-599.
 - Kojima Y., Shimizu S.; **Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU 380.** Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003:96:219-226.
 - Koshland Jr. D.E.; **Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis.** Biology Department, Brookhaven National Laboratory, Upton New York, Symposium Proc. N. A. S., 1958:v.44:98-104.
 - Kraai G.N., Winkelman J.G.M., Vries J.G., Heeres H.J.; **Kinetic on the *Rhizomucor miehei* lipase catalyzed esterification reaction of oleic acid with 1-butanol in a biphasic system.** Biochemical Engineering Journal, 2008:41:87-94.

- Krieger N., Taipa M.A., Melo E.H.M., Lima J.L., Aires-Barros M.R., Cabral J.M.S.; **Purification of *Penicillium citrinum* lipase by chromatographic processes.** *Bioprocess Eng.*, 1999: v.20: 59-65.
- Kusdiana D., Saka S.; **Methyl Esterification of free fatty acids of rapeseed oil as treated in supercritical methanol.** *Journal of chemical Engineering of Japan*, 2001:v.34:383-387.
- Kusdiana D., Saka S.; **Kinetics of transesterification in rapeseed oil to Biodiesel fuel as treated in supercritical methanol.** *Fuel*, 2001^a: v.80: 693-698.
- Labuschagne R.B., Van Tonder A., Litthauer, D. ; ***Flavobacterium odoratum* lipase: isolation and characterization.** *Enzyme and Microbial Technology*, 1997:21:52-58.
- Lanara – **Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus ingredientes.** II-Métodos Físico e Químico – Ministérios da Agricultura – Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária – Laboratório Nacional de Referência Animal. Brasília, 1981.
- Langone M.A., De Abreu M.E., Rezende M.J., Sant'Anna Jr. G.L.; **Enzymatic synthesis of médium chain monoglycerides in a solvent-free system.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2002:v.100:987-996.
- Leal M. C. M. R.; **Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios.** Rio de Janeiro: 2000. Tese de mestrado. Programa de Engenharia Química da COPPE, UFRJ
- Leblanc D., Morin A., Gu D., Zhang X.M., Bisailon J.G., Paquet M., Dubeau H.; **Short chain fatty acid esters synthesis by commercial lipases in low-water systems and by resting microbial cells in aqueous medium.** *Biotechnology Letters*, 1998:v 20:n 12:1127–1131.
- Lee Y-K, Choo C-L.; **The kinetics and mechanism of shear inactivation of lipase from *Candida cylindracea*.** *Biotechnol Bioeng.*, 1989:33:183–90.
- Lee S.Y., Rhee J.S.; **Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK.** *Enzyme Microb. Technol*, 1993:15:617–24.

- 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 Technol. Biotechnol. Brasil, Curitiba, 2003:v.41(2):105–110.
- 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**. *Biochem. Eng. J.*,2004:v.18:65-71.
- Lin S-F.; **Production and stabilization of a solvent tolerant alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111**. Journal of fermentation and Bioengineering, 1996:v.82(5):448-451.
- Lin E.S., Wang C.C., Sung S.C.; **Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnemamomea* in submerged culture**. Enzyme and Microbial Technology, 2006:v.39:98-102.
- Liu C-H., Lu W-B., Chang J-S.; **Optimizing lipase of *Burkholderia* sp. by response surface methodology**. Process Biochemistry, 2006:41:1940-1944.
- Liu Z., Chi Z., Wang L., Li J.; **Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullolans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils**. *Biochemical Engineering Journal*, 2008:40:445-451.
- Liu X.; Piao X.; Wang Y.; Zhu S.; He, H.; **Calcium methoxide as a solid base catalyst for the transesterification of soybean oil to biodiesel with methanol**. *Fuel*,2008^a :87: 1076-1082.
- Lotti M., Monticelli S., Montesinos J.L., Brocca S., Valero F., Lafuente J.; **Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase**. Chemistry and physics of lipids, 1998:v.93:148-148.
- Luo Y., Zheng Y., Jiang Z., Ma Y., Wei D.; **A novel psychrophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* with unique property in chiral resolution and biodiesel production via transesterification**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006:73:349-355.

- Ma F., Hanna M.A.; **Biodiesel Production: A review**. *Bioresource Technology*, 1999:70:1-15.
- Macedo G.A., Lozano M.M.S., Pastore G.M.; **Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase *Rhizopus* sp.** *Electronic J. Biotechnology*, 2004:v.7:72-75.
- 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*, 2002:38:715-721.
- Mahanta N., Gupta A., Khare S.K.; **Production of protease by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate.** *Bioresource Technology*, 2008:99:1729-1735.
- Makhzoum A., Owusu-Apenten R.K., Knapp J.S.; **Purification and properties of lipase from *Pseudomonas fluorescens* strain 2D.** *Int. Dairy Journal*, 1995:6:459-472.
- Mala J.G.S., Edwinoliver N.G., Kamini N.R., Puvanakrishnan R.; **Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594.** *Journal Gen. Applied Microbiology*, 2007:53, 247-253.
- Maldonado R.R., Burkert J.F.M., Maugeri F., Rodrigues M.I.; **Estudo da produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 em frascos agitados utilizando meios industriais,** in VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa, Dec., 2002:121.
- Maldonado R.R.; ***Produção, Purificação e Caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais.*** São Paulo: 2006. Dissertação de Mestrado. UNICAMP.
- Manuel F., Francisco J.P., Oscar M.N., Fuensanta R., Antonio B.; **Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes.** *J. Chem. Technol. Biotechnol*, 2000:v.75:569-576.
- Marek A., Bednarski W.; **Some factors affecting lipase production by yeasts and filamentous fungi.** *Biotechnology Letters*, 1996:18:1155-1160.

- Maria P.D., Alzamora F.M., Moreno S.P., Valero F., Rua M.L., Montero J.M.S., Sinisterra J.V., Alcantara A.R.; **Heptyl oleate synthesis as a useful tool to discriminate between lipases, proteases and other hydrolases in crude preparations.** *Enzyme and Microbial Technology*, 2002;31:283-288.
- Maria P.D., Sinisterra J.V.; **Causes of unreproducibility of *C. rugosa* lipase-catalyzed reactions in slightly hydrated organic media.** *Tetrahedron*, 1999;55:8555–8566.
- Martinez M., Vicente G., Aracil J., Esteban A.; **Kinetics of sunflower oil methanolysis.** *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2005;v.44:5447-5454.
- Martins T. S.; **Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682).** Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro: 2001. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Rio de Janeiro.
- Martins V.G., Kalil S.J., Costa, J.V.; **Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos.** *Química nova*, 2008;31: 1942-1947.
- Meira J. A., Santos M.M., Lima V.M.G., Mitchell D.A., Krieger N.; **Produção de lipases por *Burkholderia cepacia* em FES.** SINAFERM, Florianópolis – SC, 2005.
- Menoncin S.; **Concentração, imobilização e caracterização parcial de lipase produzida por *Penicillium verrucosum* utilizando fermentação em estado sólido.** Erechim – RS: 2007. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biotecnologia de Alimentos, Universidade Regional Integrada Uri- Campus de Erechim.
- Menoncin S., Domínguez N.M., Freire D.M.G., Toniazzo G., Cansian R.L., Oliveira J.V., Di Luccio M., Oliveira D., Treichel, H.; **Study of the extraction, concentration, and partial characterization of lipases obtained from *Penicillium verrucosum* using solid-state fermentation of soybean bran,** 2008: DOI 10.1007/s11947-008-0104-8.
- Miranda O.A., Salgueiro A.A., Pimentel M.C.B., Filho J.L., Melo E.H.M., Durán N.; **Lipase production by Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue.** *Bioresource Technology*, 1999;v.69:145-147.

- Mitchell D.A., Krieger N., Von Mein O.F., Luz Jr. L.F.L.; **Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors.** Biochem. Eng. J., 2003,v.13:137-147.
- Monteiro S., Sasaki G.L., Souza L.M., Meira J.A., Araújo J.M., Mitchell D., Ramos L.P., Krieger N.; **Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614.** Chemistry and Physics of Lipids, 2007: 147: 1-13.
- Montesinos J.L., Obradors N., Gordillo M.A., Valero F. S.; **Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*.** Appl. Biochemistry Biotechnology, 1996:v.59:25-37.
- Moreno J.M., Arroyo M., Hernaiz M.J., Siniesterra J.V.; **Covalent immobilization of pure isoenzymes from lipase *Candida rugosa*.** Enzyme Microb. Technol., 1997:21:552-558.
- Nahas E.; **Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growth conditions.** Journal General Microbiologic, 1995:v.134:227-233.
- Nakanishi K., Sakiyama T., Imamura K.; **On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon.** Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002:v.91:n.3:232-244.
- Nawani N., Dosanjh N.S., Kaur J.; **A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies.** Biotech Lett., 1998:20(10): 997–1000.
- Nawani N., Kaur J.; **Purification characterization and thermostability of a lipase a thermophilic *Bacillus* sp. J33.** Mol. Cell. Biochem., 2000:v.206:91-96.
- Nascimento M.G., Costa Neto P.R., Mazzuco L.M.; **Biotransformação de óleos e gorduras: utilização de lipases para obtenção de biocombustíveis.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 2004:v.33:27-38
- Noiroj K., Intarapon P., Luengnaruemitchai A., Jai-In S.; **A comparative study of KOH/Al₂O₃ and KOH/NaY catalysts for biodiesel production via transesterification from palm oil.** Renewable Energy, 2008: 1–6.

- Nouredini H., Zhu D.; **Kinetics of transesterification of soybean oil**. JAOCS, 1997:v.74:1457-1461.
- Nouredini H., Gao X., Philkana R.S.; **Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil**. Chemical and Biomolecular Engineering Research, 2004.
- Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3ª edição. São Paulo: Imprensa oficial do estado, S. A. IMESP, 1985, v 1.
- Oliveira D.T.M., **Lipase extracelular de fungo filamentoso: isolamento e caracterização parciais**. Belo Horizonte : Faculdade de Farmácia da UFMG, 2000 (Dissertação de mestrado em Ciências de Alimentos).
- Oliveira A.C., Rosa M.F., Aires-Barros M.R., Cabral J.M.S.; **Enzymatic esterification of ethanol and oleic acid – a kinetic study**. J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 2001:11:999-1005.
- Oliveira D., Di Luccio M., Faccio C., Rosa C.D., Bender J.P., Lipke N., Amroginski C., Dariva C., Oliveira J.V.; **Optimization of alkaline transesterification of soybean oil and castor oil for biodiesel production**. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2005:v.121-124:553-559.
- Orive G., Ponce R.M., Hernández A.R., Gascón M., Pedraz I.J.L.. **Biocompatibility of microcapsules for cells immobilization elaborated with different type of alginates**. Biomaterials, 2002:vol.23:3825-3831.
- Paiva A.L., Balcão V.M., Malcata F.X.; **Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases**. Enzyme and Microbial Technology, 2000:v.27:187-204.
- Palekar A.A., Vasudivan P.T., Yan S.; **Purification of lipase : a review**. Biocatalysis and Biotransformation, 2000:v.18:177-200.
- Palma M., 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**

- water of industrial babassu oil production as substrate.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2000:v.84-86:1137-1145.
- Pandey A.; **Recent process developments in solid-state fermentation.** *Process Biochemistry*, 1992:v.27:109-117.
 - Pandey A., Selvakumar P., Soccol C.R., Nigam P.; **Solid state fermentation for the production of industrial enzyme.** *Current Science*, 1999:v.77:149-162.
 - Pandey A. Soccol C.R., Nigam P., Soccol V. T.; **Biotechnological potential agroindustrial residues. I: sugarcane bagasse.** *Biores. Technol.*, 2000:v.74:69-80.
 - Pandey A., Soccol C.R.; **Solid state fermentation: fundamentals and applications.** Londres, Asiatec Publishers, 2001.
 - Pandey A.; **Solid-state fermentation.** *Biochemistry Engineering Journal*, 2003:v.13:81-84.
 - Papaparaskevas D., Christakopoulos P., Kekos D., Macris B.J.; **Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodoturula glutinis*.** *Biotechnol. Lett.*, 1992:14:397-402.
 - Park Y.M., Lee J.Y., Chung S.H., Park I.S., Lee S.Y., Kim D.K., Lee J.S., Lee K.Y.; **Esterificacao of used vegetable oils using the heterogeneous WO₃/ZrO₂ catalyst for production of biodiesel.** *Bioresource Technology*, 2009.
 - Pastore M.G., Costa V.S.R., Koblitaz M.G.B.; **Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 2003:v.23:n.2:101-106.
 - Patel R.N.; **Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals.** *Enz. Microbial Technol.*, 2002:v.31:804-826.
 - Pencreac'h G., Baratti J.C.; **Comparison of hydrolysis activity in water an heptanes fot thirty-Two commercial lipase preparations.** *Enzyme and Microbial Technolody*, 2001:28:473-479.

- Persson M., Mladenoska I., Wehtje E., Patrick Adlercreutz P.; **Preparation of lipases for use in organic solvents.** *Enzyme and Microbial Technology*, 2002:31:833–841.
- Pertersen M., Daniel R.; **Purification and characterization of an extracellular lipase from *Clostridium tetanomorphum*.** *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2006: 22: 431-435.
- Philips A., Pretorius G.H.J.; **Purification and characterization of an extracellular lipase of *Glactomyces geotrichum*.** *Biotechnology Letters*, London, : 1991:v.13:833-838.
- Pintado J., Torrado a. González M.P., Murado M.A, **Optimization of nutrient concentration for citric acid production by solid –state cultura of *Aspergillus niger* on polyurethane foams.** *Enz. And Microbial Technology*, 1998:v.23:149-156.
- Pizarro A.V.L., Park E.Y.; **Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth.** *Process Biochemistry*, 2003:v.38:1077-1082.
- Pleiss J., Fischer M., Schmid R.D.; **Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid site.** *Chemistry and Physics of Lipids*, 1998:v.93:67-80.
- Powell L.W.; In: **Microbial Enzyme and Biotechnology**, London, Elsevier Science Publishers, 1990.
- 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*, 2006:37:505-5-9.
- Qi W-T., Ma J., Yu W-T., Xie Y-B., Wang W., Ma X.; **Behavior of microbial growth and metabolism in alginate-chitosan-alginate (ACA) microcapsuls.** *Enzyme and Microbial Technology*, New York, 2006:v.38:697-704.
- Raghavarao K.S.M.S., Ranganathan T.V., Karanth N.G.; **Some engineering aspects of solid-state fermentation.** *Biochemical Engineering Journal*, 2003:13:127-135.

- Rahardjo Y.S.P., Jolink F., Haemers S., Tramper J., Rinzema A.; **Significance of bed porosity, bran and specific surface area in solid-state cultivation of *Aspergillus oryzae***. *Biomolecular Engineering*, 2005:22:133-139.
- Ramachandran S. patel A.K., Madhavan Nampoothiri K., Francis F., Nagy V., Szakacs G., Pandey A.; **Coconut oil cake-a potential raw material for the production of α -amilase**. *Bioresource Technology*, 2004:93:169-174.
- Ramachandran S., Singh S.K., Larroche C., Soccol C.R., Pandey A.; **Oil cakes and their biotechnological applications-A review**. *Bioresource Technology*, 2007:98:2000-2009.
- Ramos L.P., Kucek K.T., Domigos A.K., Wilhelm H.M.; **Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil**. *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento*, 2003:v.31:27-37.
- Rampim M.A.; **Síntese de ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de mamona e soja utilizando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LIPOZYME TL IM)**. Ribeirão Preto – SP: 2007. Dissertação de Mestrado Departamento de Química. Universidade de São Paulo- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.
- Razak C.N.A., Salleh A.B., Musani R., Samad M.Y., Basri M.; **Some characteristics of lipases from thermophilic fungi isolated from palm oil effluent**. *Journal of Molecular Catalysis*, 1997:3:153-159.
- Reetz M.T., Zonta A., Simpelkamp J.; **Efficient immobilization of lipase by entrapment in hydrophobic sol-gel materials**. *Biotechnol. Bioeng.*, 1996:49:194-199.
- Rigo E.; **Produção e caracterização parcial de lipases com atividade de hidrólise e síntese por fermentação em estado sólido**. Florianópolis: 2009, Tese de Doutorado, Departamento de Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Risso F.V.; **Síntese de oligossacarídeos em meio orgânico e aquoso utilizando-se inulinase livre e imobilizada produzida por *Kluuveromyces***

- marxianus* ATCC 16045 e NRRL Y-7571. Campinas – SP: 2004. Tese de Doutorado Departamento de Engenharia de Alimentos. Universidade estadual de Campinas.
- Robinson T., Nigan P.; **Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation.** Biochemical Engineering Journal, 2003:v.13:197-203.
 - Rocha J.M.S., Gil M.H., Garcia F.A.P.; **Effects of additives on the activity of a covalently immobilized lipase in organic media.** Journal of Biotechnology, 1998:v.66:61-67.
 - Rocha W. S., Grosso C.R.F.; **Permeação de solutos de diferentes massas moleculares em matrizes compostas de alginato de cálcio e acetofitalato de celulose.** Sitientibus, Feira de Santana, 2006:n.35:125-148.
 - Rodendo O., Herrero A., Bello J.F., Roig M.G., Calvo M.V., Plou F.J., Burquillo F.J.; **Comparative kinetics study of lipases A and B from *Candida rugosa* in the hydrolysis of lipid-nitrophenyl esters in mixed micelles with TritonX-100.** Biochemical Biophys Acta, 1995:1243:15-24.
 - Rodrigues M.S.M.; **Produção de lipases e sua aplicação na eliminação de resinas em lignocelulósicos.** Campinas: 1997. Tese de Doutorado Departamento de Química Orgânica. Universidade Estadual de Campinas.
 - 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, 2006:41: 2264-2269.
 - Rua M.L., Ballesteros A.; **A rapid purification of two lipase isoenzyme from *Candida rugosa*.** Biotechnology Techniques, 1994:v.8:n.1:21-26.
 - Ruiz C., Falcocchio S., Xoxi E., Pastor F.I.J., Diaz P., Saso L.; **Activation and inhibition of *Candida rugosa* and *Bacillus*- related lipases by saturated fatty**

- acids, evaluated by a new colorimetric microassay. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004:1672:184-191.
- Ruiz A.M., Garcia H.S., Castañeda G.S., Torres E.F.; **Organic phase synthesis of ethyl oleate using lipases produced by solid-state fermentation.** Applied Biochemistry Biotechnology, 2008: DOI 10.1007/s12010-008-8207-2.
 - Sabuquillo P. Reina J. Fernández-Lorente G. Guisan J.M., Fernández-Lafuente R.; **Interfacial affinity chromatography of lipase: Separation of different fractions by selective adsorption on supports activated with hydrophobic groups.** Biochimic and Biophysic Acta, Amsterdam, 1998:v.1388:337-348.
 - Sangsurasak P., Mitchell D.A.; **Validation of model describing two-dimensional heat transfer during sold-state frmentation in packed bed bioreactors.** Biotechnol. And Bioeng., 1998: v.60: 739-749.
 - Sato K., Sudo S.; **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology – Small-scale solid-state fermnetations.** 2ª edição, Washington, 1999, p.61-79.
 - Saxena R.K., Ghosh P.K., Gupta R., Davidson W.S., Bradoo S., Gulati R.; **Microbial Lipases: Potential biocatalysts for the future industry.** Curr. Sci., 1999: v.77: 101-115.
 - Saxena R.K., Sheoran A., Giri B., Davidson W.S. **Purification strategies for microbial lipases.** *Journal Microbiology Methodology*, 2003:v.52:1-18.
 - Schmid R.D.; **Lipases: interfacial enzymes with attractive applications.** Angew Chem Int Ed., 1998: 37:1608–1610.
 - Sharma R, Chisti Y., Banerjee U.C.; **Production, purification, characterization, and applications of lipases.** Biotechnology Advances, 2001:19:627-662.
 - Sharma R., Soni S.K., Vohra R.M., Gupta L.K., Gupta J.K.; **Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus sp.* RSJ-1.** Process Biochemistry, 2002: 37: 1075-1084.
 - Sharon C., Furugoh S., Yamakido T., Ogawa H., Kato Y.; **Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis.** J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 1998: 20:304–307.

- Shirazi S.H., Rahman S.R., Rahman M.M., **Short communication: production of extracellular lipase by *Saccaromyces cerevisiae***. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 1998: v.14: 595-597.
- Shu C.H., Xu C.J., Lin G.C.; **Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea***. *Process Biochemistry*, 2006: 41: 734-738.
- Silva C.H., Puls J., Souza M.V., Ferreira Filho E.X.; **Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures *Aspergillus fumigates fresenius***. *Revista de Microbiologia*, 2000: v.28:152-156.
- Silva W.O.B., Miditieri S., Schrank A., Vainstein M.H.; **Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae***. *Process Biochemistry*, 2005: n.40: 321-326.
- Silva C., Weschenfelder T.A., Rovani S., Corazza F.C., Corazza M.L., Dariva C., Oliveira J.V. **Continuous production of fatty ethyl esters from soybean oil in compressed ethanol**. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2007: v.46: 5304- 5309.
- Silva C.; **Produção contínua de biodiesel por transesterificação não catalítica de óleo de soja**. Maringá –PR, 2008. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá.
- Soccol C.R., Vandenberghe L.P.S.; **Overview of applied solid-state fermentation in Brazil**. *Biochemical Engineering Journal*, 2003: 13: 205-218.
- Srivastava A., Prasad R.; Triglycerides – based diesel fuels. *Renewable & Sustainable Energy Rev.*, 2000: 4: 111-333.
- Smits J.P., Rinzema A., Tramper J., Schlosser E.E., Knol W.; **Accurate determination of process variables in a solid state fermentation system**. *Process Biochemistry*, 1996:v.31:n.7:669-678.
- Soliman N., knoll M., Abdel-Fattah Y.R., Schmid R.D., Lange S.; **Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN Isolated from desert soil in Egypt**. *Process Biochemistry*, 2007: 42: 1090-1100.

- Stocklein W., Sztajer H., Menge U., Schmidt R.D.; **Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum***. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993:v.1168:n.2:181-189.
- Sugihara A., Veshima M., Shimada Y., Tsunasawo S., Tominaga Y.; **Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia***. *Journal Biochemistry*, 1992: v.112: 598-603
- Sun S.Y., Xu Y.; **Solid-state fermentation for whole-cell synthetic lipase production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme**. *Process Biochemistry*, 2008:43:219-224.
- Suryanarayan, S.; **Current industrial practice in solid state fermentations for secondary metabolite production: the Biocon India experience**. *Biochemical Engineering Journal*, 2003: 13: 189-195.
- Sztajer H., Lünsdorf H., Erdmann H., Menge U., Schmid R.; **Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum***. *Biochim Biophys Acta* 1992: 1124: 253-261.
- Sztajer H., Menge U., Schmid R.D.; **Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum***. *Biochim Biophys Acta*, 1993:1168:181–189.
- Takaç S., Marul B.; **Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis***. *J. Ind. Microbial Biotechnol.*, 2008: 35: 1019-1025.
- Tan T., Zhang M., Wang B., Ying C., Deng Li.; **Screening of high lipase producing *Candida* sp. And production of lipase by fermentation**. *Process Biochemistry*, 2003: 39: 459-465.
- Tawaki S.H., Klibanov A.M.; **Chemoselectivity of enzymes in anhydrous media is strongly solvent dependent**. *Biocatalysis*, 1993: 8: 3–19.
- Tirawongsaroj P., Sriprang R., Harnpicharnchai P., Thongaram T., Champreda V., Tanapongpipat S.; **Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from Thailand hot spring metagenomic library**. *Journal of Biotechnology*, 2008: 133: 42-49.

- Toida, J.; Kondoh, K.; Fukuzawa, M.; Ohnishi, K. e Sekiguchi, J. **Purification and characterization of lipase from *Aspergillus oryzae***. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 1995: v. 59: n.7: 1199-1203.
- Torres S., Castro G.; **Non-aqueous biocatalysis in homogenous systems**. *Food Technology Biotechnology*, 2004: 42: 271-277.
- Treichel H., Oliveira D., Mazutti M.A., Di Luccio M., Oliveira V.J.; **A review on Microbial Lipases production**. *Food Bioprocess Technology*, 2009: DOI 10.1007/s11947-009-0202-2.
- Tweddell R., Kermasha S., Combes D., Marty a.; **Esterification and interesterification activities of lipase from *Rhizopus niveus* and *Mucor miehei* in three different types of organic media: a comparative study**. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997: 22: 439-445.
- Ul-Haq I., Idrees S., Rajoka M.I.; **Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation**. *Process Biochemistry*, 2002: 37: 637-641.
- Vargas G.D.L.P. **Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato**. Erechim: 2004. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada.
- Vargas, G.D.L.P., Treichel H., Oliveira D., Beneti S.C., Freire D.M.G., Di Luccio M.; **Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal**. *J. Chem. Technol Biotechnol*, 2008: 83: 47-54.
- Vermuë M.H., Tramper J.; **Biocatalysis in non-conventional media: medium engineering aspects**. *Pure & Applied Chemistry*, 1995: v.67: n.2: 345-373.
- Villeneuve P., Muderhwa J.M., Graille J., Haas M.M.; **Customizing Lipases for Biocatalysis: a Survey of Chemical, Physical and Molecular Biological Approches**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2000: 9: 113-148.
- Villeneuve P.; **Lipases in lipophilization reactions**. *Biotechnology Advances*, 2007: 25: 515-536.

- Von Meien O.F., Mitchell D.A.; **A two phase model for water and heat transfer within an intermittently-mixed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration.** *Biotechnol. And Bioeng.*, 2002: v.79: 416-428.
- Xu H., Li M., He B.; **Immobilization of *Candida cylindracea* lipase on methyl acrylate-divinyl benzene copolymer and its derivatives.** *Enzyme Microb. Technol.*, 1995: 17:194-199.
- Xu X.B.; **Biodiesel using bioprocessing technologies: The time is coming?**, *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, 2008: 110: 863-864.
- Wang Y., Srivastava K.C., Shen G.J., Wang H.Y.; **Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC 53841).** *J. Fermentation and Bioengineering*, 1995: 79:433-438.
- Wang D., Xu Y., Tianyu S.; **Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media.** *Biochem. Engineering J.*, 2008: 32.
- Wolski E. **Estudo comparativo da produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Penicillium* sp. livre e imobilizado.** Erechim, 2008. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada.
- Wolski E., Rigo E., Di Luccio M., Oliveira J.V., Oliveira D., Treichel H.; **Production and partial characterization of lipases from a newly isolated *Penicillium* sp. using experimental design.** *Letters in Applied Microbiology*, 2009^a: 49, 60-66.
- Wolski E., Menusi E., Remonato D., Vardanega R., Arbter F., Rigo E., Mazutti M.A., Di Luccio M., Ninow J., de Oliveira D., Treichel H.; **Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid state and submerged fermentation: a comparative study.** *LWT - Food Science and Technology*, 2009^b: doi: 10.1016/j.lwt.2009.04.006.

7 Referências Bibliográficas

- Zarevúcka M., Kejík Z., Saman D., Wimmer Z., Demnerová K.; **Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum***. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005: 37: 481-486.
- Zhu K., Jutila A., Tuominen E.K.J., Patkar S.A., Svendsen A., Kinnunen P.K.; **Impact of the tryptophan residues of *Humicola lanuginosa* lipase on its thermal stability**. *J Biochim Biophys Acta*, 2001: 1547: 329–38.

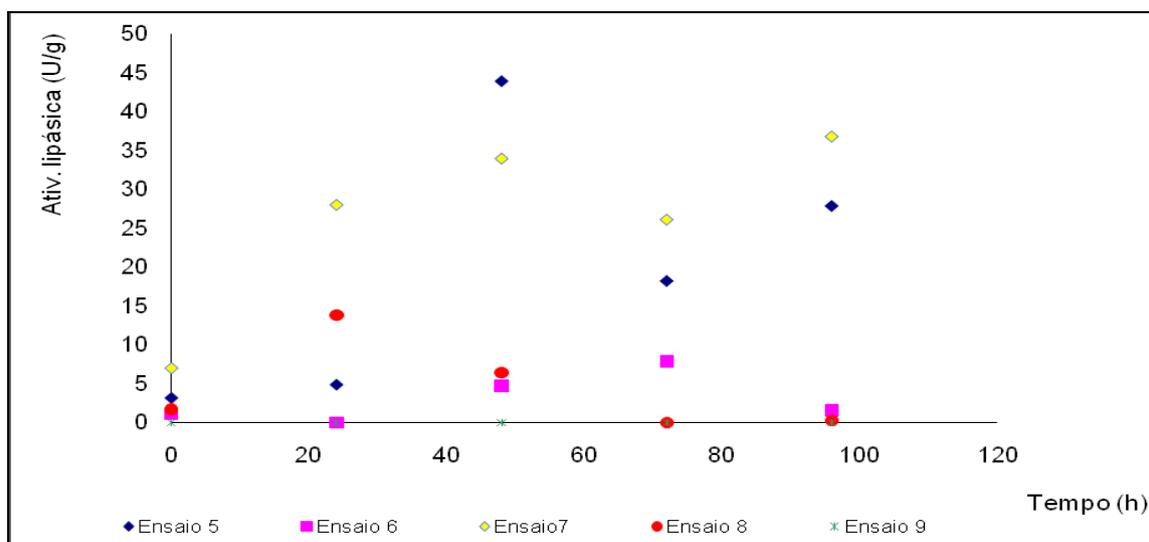
ANEXOS

Anexo 1

Teste preliminar com *P. brevicompactum* e *P. verrucosum* utilizando como meio torta de babaçu. A Tabela 1 e o Gráfico 1 mostram a cinética dos testes preliminares de produção enzimática por FES, utilizando *P.brevicompactum* e *P.verrucosum* em torta de babaçu.

Tabela 1 – Cinética da atividade lipásica dos testes preliminares com *P.brevicompactum* e *P. verrucosum* por FES utilizando como meio torta de babaçu.

Ensaio	Atividade lipásica (U/g)				
	0	24	48	72	96
5	3,12	4,83	43,94	18,19	27,86
6	1,07	0,00	4,70	7,83	1,57
7	7,02	27,94	33,87	26,05	36,70
8	1,71	13,79	6,45	0,00	0,29
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00



Onde: Ensaio 5 – Utilizou-se o micro-organismo *P.brevicompactum* e meio suplementado com 2% de melação pré-tratado.

Ensaio 6 – Utilizou-se o micro-organismo *P.verrucosum* e meio suplementado com 2% de melação pré-tratado.

Ensaio 7 – Utilizou-se o micro-organismo *P.brevicompactum* e meio sem suplementação.

Ensaio 8 – Utilizou-se o micro-organismo *P.verrucosum* e meio sem suplementação.

Ensaio 9 – Utilizou-se somente meio e água para controle do experimento

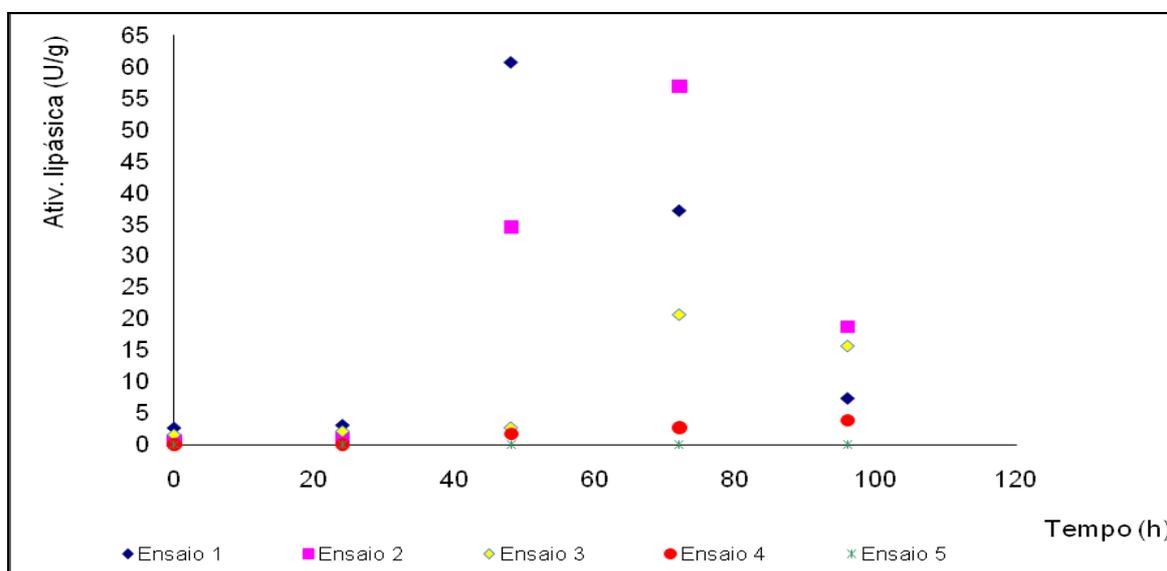
Nota-se que o ensaio com maior atividade enzimática é o ensaio 5 com 48h , onde o meio foi suplementado com 2% de melação e a cepa utilizada foi *P.brevicompactum*, portanto é necessário a suplementação do meio .

Anexo 2

Teste preliminar com *P. brevicompactum* e *P. verrucosum* utilizando como meio farelo de mamona. A Tabela 2 e o Gráfico 2 mostram a cinética dos testes preliminares de produção enzimática por FES, utilizando *P.brevicompactum* e *P.verrucosum* em farelo de mamona.

Tabela 2 – Cinética da atividade lipásica dos testes preliminares com *P.brevicompactum* e *P. verrucosum* por FES utilizando como meio farelo de mamona.

Ensaio	Atividade lipásica (U/g)				
	0	24	48	72	96
1	2,61	3,06	60,71	37,15	7,32
2	0,62	1,03	34,57	56,93	18,76
3	1,49	2,04	2,61	20,57	15,59
4	0,00	0,00	1,73	2,68	3,90
5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00



Onde: Ensaio 1 – Utilizou-se o micro-organismo *P.brevicompactum* e meio suplementado com 2% de melação pré-tratado.

Ensaio 2 – Utilizou-se o micro-organismo *P.brevicompactum* e meio sem suplementação.

Ensaio 3 – Utilizou-se o micro-organismo *P.verrucosum* e meio suplementado com 2% de melação pré-tratado.

Ensaio 4 – Utilizou-se o micro-organismo *P.verrucosum* e meio sem suplementação.

Ensaio 5 – Utilizou-se somente meio e água para controle do experimento

Nota-se que o ensaio com maior atividade enzimática é o ensaio 1 com 48h , onde o meio foi suplementado com 2% de melaço ,seguido pelo ensaio 2 com 72h com meio sem suplementação, em ambos os casos a cepa utilizada foi *P.brevicompactum* portanto é necessário a suplementação do meio .Porém quando a cepa utilizada é *P.verrucosum* a atividade lipásica decresce mesmo com o meio suplementado .