

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

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LIPASE
PRODUZIDA POR *Penicillium brevicompactum*
EM BIORREATOR DE LEITO FIXO UTILIZANDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATOS

Sheila Maria Predabon

ERECHIM, RS - BRASIL

MARÇO 2011

SHEILA MARIA PREDABON

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LIPASE
PRODUZIDA POR *Penicillium brevicompactum*
EM BIORREATOR DE LEITO FIXO
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO**

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

Orientadoras: Helen Treichel

Débora de Oliveira

ERECHIM, RS - BRASIL

MARÇO 2011

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LIPASE PRODUZIDA POR
Penicillium brevicompactum
EM BIORREATOR DE LEITO FIXO UTILIZANDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATOS

Sheila Maria Predabon

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Mestrado 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:

Helen Treichel, D. Sc
(Orientadora)

Débora de Oliveira, D. Sc
(Orientadora)

Morgana Karen Pierozan, D. Sc
(UDESC)

Rogério Marcos Dallago, D. Sc
(URI-Campus Erechim)

Erechim, 28 de março de 2011

***Dedico esta conquista a minha mãe
Lenir Facciochi e ao meu irmão
Juliano Francisco Predabon
EU AMO VOCÊS!***

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

À minha mãe Lenir Facciochi, pelo amor, carinho, por ser o meu porto seguro, e por me ensinar a cada dia ser uma pessoa mais humana, mais justa. Ao meu irmão Juliano Francisco Predabon, por ser especial, me ajudando sempre quando eu precisei, por dividir suas coisas comigo.

À Lucy pelos conselhos, incentivo, por mostrar o caminho certo, pela luz nas horas difíceis.

À amiga Stéphanie Caroline Beneti, por ter reencontrado depois de alguns anos e ter me ajudado a entrar no curso, me recebendo em sua casa, por compartilhar as alegrias nas conquistas do dia a dia e as lágrimas dos momentos ruins, pelos conselhos, por ser um ombro amigo para todas as horas, por não medir esforços em me ajudar.

À amiga Marceli Fernandes Silva, por ter me ensinado a trabalhar no desenvolvimento deste trabalho, por dividir sempre suas experiências obtidas nos projetos, por ser uma pessoa que nas horas que eu precisei sempre me ajudou, mesmo em finais de semana e feriados, pelo sorriso depois de um dia cansativo, pelo abraço de carinho, pelas risadas, pelas palavras de incentivo nos momentos complicados.

À amiga Silvana Menoncin, por me ajudar sempre que foi possível, por dividir seus conhecimentos, pelos conselhos. Às amigas, Mara, Simone, Luciane Batistella, Jamile, Jonaína, Juliana e Catiane pelos favores, apoio e pela companhia.

Às minhas orientadoras Helen Treichel e Débora de Oliveira, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pelo auxílio no desenvolvimento dele.

Aos professores Marco Di Luccio, José Vladimir de Oliveira, Márcio Mazutti, Cláudio Zarkzewski, Eunice Valduga e Geciane Toniazzo.

Ao pessoal dos Laboratórios: Ise, Morgana, Viviane, Daniela Oliveira, Aline, Diane, Hélin, Aline Richetti, Daniela (Peke), Ilizandra (Sandy), Lindomar, Marcos, Marcus Tres, Ricardo, Karine, Lídia, Chaline, Naira, Lenir e Robison.

Ao pessoal da Central de Materiais, por estarem sempre dispostos a ajudar.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e a todas que torceram por mim. Devo isso a vocês. Muito obrigado!

RESUMO

As lipases constituem, atualmente, um importante grupo de enzimas com enorme potencial para aplicações biotecnológicas. As lipases (EC 3.1.1.3) pertencem à família das hidrolases e estão associadas ao metabolismo e à hidrólise dos lipídios, amplamente distribuídos na natureza. Atuam, por definição, na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas e liberando ácidos e álcoois orgânicos. Entretanto, a reação inversa, esterificação, pode ocorrer em ambientes com restrição de água. O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de lipase por fungo *Penicillium brevicompactum* por fermentação em estado sólido em biorreator de leito fixo. Os efeitos das variáveis estudadas para o processo de maximização da produção das enzimas foram investigados utilizando-se a técnica de planejamento experimental. A condição utilizada para a produção de lipase em biorreator de leito fixo foi de 55% de umidade e temperatura de 30°C. Para a produção da enzima com a mistura de farelo de arroz e casca de arroz, a máxima atividade de esterificação obtida foi de 147,07U/g. Para a produção com a mistura de farelo de soja e casca de arroz, a máxima atividade de esterificação obtida foi de 51,22U/g. Utilizando farelo de soja e casca de soja como substrato, a máxima atividade de esterificação foi de 98,83U/g. O extrato enzimático bruto que apresentou melhor estabilidade em baixas temperaturas em 27 dias foi o extrato obtido da fermentação com a mistura de farelo de soja e casca de soja. Para a estabilidade do extrato enzimático em altas temperaturas, o extrato que apresentou melhor estabilidade em 27 dias foi o extrato obtido da fermentação com a mistura de farelo de soja e casca de soja. Os extratos enzimáticos brutos apresentaram maior especificidade por ácidos graxos de cadeias longas e álcoois de cadeias longas. Os extratos enzimáticos brutos foram utilizados como catalisadores em reação de alcóolise para produção de biodiesel. O extrato obtido a partir de farelo de soja e casca de arroz conduziu a conversões da ordem de 3%, usando como substrato óleo de oliva e etanol em solvente orgânico.

ABSTRACT

Lipases (triacylglycerol hydrolases, E.C. 3.1.1.3) are a part of the hydrolase family which act in carboxylic ester bounds and have been standing out in the biotechnology field as they are versatile enzymes that accept a wide range of substrates. They act, by definition, in the organic-water interface, catalyzing the carboxylic ester bounds hydrolysis and releasing alcohols and organic acids. However, the esterification inverse reaction can occur in water restricted environments. The objective of this work was to investigate the lipase production by *Penicillium brevicompactum* in solid state fermentation using a fixed bed bioreactor configuration. The effect of process variables was evaluated by experimental design technique, aiming at maximizing the lipase production. The experimental condition of 55% of moisture content and 30°C was used in fixed bed bioreactor. Using rice bran and rice husk as substrates, esterification activities of 147.07U/g were reached. The use of soybean bran and rice husk as substrates led to maxima esterification activities of 51.22U/g. Soybean bran and soybean husk as substrates permitted obtain activities of 98.83U/g. The crude enzymatic extract that presented higher stability at low temperatures after 27 days of storage was that obtained using soybean bran and soybean husk as substrates. Higher stability at high temperature was achieved by the fermented soybean bran and soybean husk, after 27 days of storage. The crude enzymatic extracts presented higher specificity to long chain fatty acids and alcohols. The crude extracts were used as catalysts for biodiesel production by alcoholysis reaction. The extract obtained from soybean bran and rice husk led to biodiesel conversions of about 3%, using olive oil and ethanol as substrates and n-hexane as solvent.

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
INDICE DE TABELAS.....	x
INDICE DE FIGURAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. ENZIMAS	3
2.2. LIPASES.....	4
2.2.1 Lipases microbianas	5
2.2.2 Produção de lipases microbianas	6
2.3. APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DAS LIPASES	6
2.4. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	8
2.4.1 Características da fermentação em estado sólido.....	11
2.4.2 Produção de lipase por fermentação em estado sólido.....	13
2.5. PRÉ-PURIFICAÇÃO DAS LIPASES	15
2.6. CARACTERIZAÇÃO DE LIPASES.....	16
2.6.1 Especificidade pelo substrato.....	16
2.6.2 Estabilidade térmica.....	17
2.7 A IMPORTÂNCIA INDUSTRIAL DOS ÉSTERES.....	18
2.8. BIORREADORES E FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	19
2.8.1 Biorreator tipo bandeja.....	20
2.8.2 Biorreatores de leito fixo	20

2.8.3 Biorreator de tambor rotativo	21
2.8.4 Biorreator de leite fluidizado e de leite agitado.....	22
2.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 MATERIAIS.....	25
3.2 EQUIPAMENTOS	26
3.3 MÉTODOS.....	26
3.3.1 Micro-organismo	27
3.3.2 Manutenção da cepa	27
3.3.3 Fermentação em estado sólido (FES).....	28
3.3.3.1 Inóculo	28
3.3.3.2 Substratos	28
3.3.3.3 Estudo da produção de lipases	29
3.3.4 <i>Avaliação da produção de lipase por fermentação em estado sólido (FES) em béqueres</i>	30
3.3.4.1 Suplementação do meio	30
3.3.5 Estudo da produção de lipase em biorreator de leite fixo	31
3.3.5.1 Monitoramento da temperatura	32
3.3.5.2 Monitoramento da produção de CO₂	32
3.3.5.3 Processo de extração da enzima	32
3.3.6 Determinação da atividade de esterificação.....	33
3.3.7 Concentração da lipase	34
3.3.8 Caracterização parcial do extrato enzimático bruto.....	35
3.3.8.1 Especificidade do extrato enzimático com atividade de esterificação	35
3.3.8.2 Estabilidade em altas temperaturas	35
3.3.8.3 Estabilidade em baixas temperaturas	35
3.3.9 Estudo preliminar da alcoólise de óleo vegetal utilizando lipase de <i>Penicillium brevicompactum</i> como catalisador.....	36

3.3.9.1 Substrato e solvente	36
3.3.9.2 Procedimento experimental para a reação	36
3.3.9.3 Determinação da conversão da reação	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. ESTUDO DA PRODUÇÃO DE LIPASE	38
4.1.1 Ensaio da produção de lipase em béqueres	38
4.1.2 Concentração do extrato enzimático com sulfato de amônio	43
4.2 PRODUÇÃO DE LIPASES EM BIORREATOR DE LEITO FIXO	46
4.2.1 Estudo da produção de lipase em biorreator de leito fixo utilizando farelo de arroz e casca de arroz como substratos	48
4.2.2 Estudo da produção de lipase em biorreator de leito fixo utilizando farelo de soja e casca de arroz como substratos	49
4.2.3 Estudo da produção de lipase em biorreator de leito fixo utilizando farelo de soja e casca de soja como substratos	50
4.2.4 Concentração por precipitação com sulfato de amônio dos extratos enzimáticos obtidos por fermentação em biorreator de leito fixo	51
4.2.5 Avaliação cinética da temperatura e produção de CO ₂	53
4.3 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO ENZIMÁTICO	59
4.3.1 ESTABILIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS	59
4.3.2 Estabilidade em baixas temperaturas	59
4.3.3 Estabilidade do extrato enzimático em altas temperaturas	62
4.3.4 Especificidade do extrato enzimático bruto frente a diferentes substratos	66
4.4 APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO NA ALCOÓLISE DE ÓLEO VEGETAL	69
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	72
5.1 CONCLUSÕES	72
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicação de lipases em diferentes indústrias.....	8
Tabela 2 - Principais microrganismos e substratos envolvidos na produção de lipases por FES.....	10
Tabela 3 - Variáveis e níveis estudados nos planejamentos 1 e 2.....	29
Tabela 4 - Matriz do planejamento experimental (1) (valores reais e codificados) com as respostas da atividade de esterificação do extrato enzimático bruto.....	38
Tabela 5 - Análise de variância para a atividade de esterificação no tempo de 72 horas utilizando <i>P. brevicompactum</i> e farelo de arroz como substrato.	40
Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental (2) (valores reais e codificados) com a atividade de esterificação, extrato enzimático bruto com 3% de óleo de soja.....	41
Tabela 7 - Matriz do planejamento experimental (1) (valores reais e codificados) com a atividade de esterificação do extrato enzimático concentrado com sulfato de amônio 60% de saturação e extrato bruto.....	44
Tabela 8 - Matriz do planejamento experimental (2) (valores reais e codificados) com a atividade de esterificação do extrato enzimático concentrado com sulfato de amônio e extrato bruto.	45
Tabela 9 - Atividade de esterificação do extrato bruto, fermentação com FA+CA em biorreator de leito fixo.....	47
Tabela 10 - Atividade de esterificação do extrato bruto, fermentação com FS+CA em biorreator de leito fixo.....	47
Tabela 11 - Atividade de esterificação do extrato bruto, fermentação com FS+CS em biorreator de leito fixo.....	47
Tabela 12 - Atividade de esterificação do extrato precipitado, fermentação com FA+CA em biorreator de leito fixo.	51
Tabela 13 - Atividade de esterificação do extrato precipitado, fermentação com FS+CA em biorreator de leito fixo.	52
Tabela 14 - Atividade de esterificação do extrato precipitado, fermentação com FS+CS em biorreator de leito fixo.	52
Tabela 15 - Conversões obtidas na alcoólise enzimática de diferentes óleos em solvente orgânico. Extrato enzimático bruto.....	70

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama esquemático do biorreator de leito fixo: a) compressor; b) umidificador; c) controle de vazão, temperatura e umidade; d) sensores de temperatura; e) medidor de CO ₂ , temperatura e umidade.	31
Figura 2 - Superfície de resposta para atividade de esterificação (a), curva de contorno (b), extrato bruto, planejamento 1.	41
Figura 3 - Efeitos das variáveis manipuladas sobre a atividade de esterificação do extrato bruto liofilizado referente ao planejamento experimental 2.	43
Figura 4 - Efeito das variáveis manipuladas sobre a atividade de esterificação do extrato concentrado liofilizado referente ao planejamento experimental 1.	45
Figura 5 - Aparência do meio fermentado no biorreator de leito fixo com farelo de arroz e casca de arroz após 72 horas de fermentação. Amostra coletada no topo do fermentador.	48
Figura 6 - Aparência do meio fermentado em biorreator de leito fixo com FS+CA (a), e a aparência do meio fermentado em béquer com FS (b).	49
Figura 7 - Aparência do meio fermentado em biorreator de leito fixo com FS+CS (a), e a aparência do meio fermentado em béquer com FS (b).	50
Figura 8 - Perfis experimentais para temperatura (a), e perfis de CO ₂ (b) obtidos nos experimentos de avaliação do processo de produção de lipase, fermentação com FA+CA.	54
Figura 9 - Perfis experimentais para temperatura (a), e perfis de CO ₂ (b) obtidos nos experimentos de avaliação do processo de produção de lipase, fermentação com FS+CA.	56
Figura 10 - Perfis experimentais para temperatura (a), e perfis de CO ₂ (b) obtidos nos experimentos de avaliação do processo de produção de lipase, fermentação com FS+CS.	57
Figura 11 - (a) Estabilidade do extrato enzimático armazenado em geladeira (4°C), (b) estabilidade do extrato enzimático armazenado em freezer (-10°C) e (c) estabilidade do extrato enzimático armazenado em freezer (-80°C).	61
Figura 12 - Estabilidade do extrato enzimático armazenado em 40°C. Amostra 1 (FA+CA); Amostra 2 (FS+CS); Amostra 3 (FS+CS).	63
Figura 13 - Estabilidade do extrato enzimático armazenado em 50°C. Amostra 1 (FA+CA); Amostra 2 (FS+CA); Amostra 3 (FS+CS).	64

Figura 14 - Estabilidade do extrato enzimático armazenado em 60°C. Amostra 1 (FA+CA); Amostra 2 (FS+CA); Amostra 3 (FS+CS).....	65
Figura 15 - Especificidade do extrato enzimático da reação com diferentes álcoois e diferentes ácidos graxos. Amostra 1 (FA+CA).	67
Figura 16 - Especificidade do extrato enzimático da reação com diferentes álcoois e diferentes ácidos graxos. Amostra 2 (FS+CA).	68
Figura 17 - Especificidade do extrato enzimático da reação com diferentes álcoois e diferentes ácidos graxos. Amostra 3 (FS+CS).	68

1. INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica-aquosa catalisando as reações de hidrólise de triglicerídeos. Em baixas concentrações de água podem ainda catalisar reações de esterificação, transesterificação ou interesterificação. Além das vantagens clássicas das enzimas, as lipases microbianas apresentam uma série de vantagens se comparadas com as lipases extraídas de fontes animais e vegetais. Estas vantagens estão relacionadas a algumas das características peculiares das lipases como a sua região-enâncio seletividade, a estabilidade a altas temperaturas e atuação em amplas faixas de pH (Essamri *et al.*, 1998; Maia *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2001).

A produção de resíduos agroindustriais tem aumentado anualmente, e com ela cresce a preocupação em relação à utilização mais eficiente dos mesmos. Por isso, vários processos que usam estes resíduos como substratos estão sendo desenvolvidos para a produção de substâncias químicas e produtos de maior valor comercial. Muitas indústrias têm investido no uso de micro-organismos como agentes redutores destes materiais, sendo as enzimas substâncias de grande aplicação nestes processos. Dentre as enzimas de grande interesse industrial, destacam-se as lipases, comumente utilizadas nas indústrias de alimentos como aditivos, na química fina (síntese de ésteres), detergentes, tratamento de efluentes, de couro, farmacêutica e área médica. A utilização de subprodutos agroindustriais como substratos na produção de lipases possibilita a agregação de materiais de baixo custo no mercado, podendo reduzir o seu preço final, além de contribuir na busca por combinações ideais para se obter altos rendimentos na produção das mesmas (Sun e Shu, 2009).

Muitos trabalhos sobre fermentação em estado sólido (FES) foram recentemente publicados utilizando subprodutos agrícolas para produção de enzimas. Processos de FES são de interesse em especial para os países com uma abundância de resíduos agroindustriais, pois estes constituem uma alternativa de matéria-prima de baixo custo comparado a outros substratos e contribuem com os problemas de poluição e/ou estocagem desses resíduos.

Processos biotecnológicos, especialmente a técnica de FES, têm contribuído enormemente para tal utilização (Treichel *et al.*, 2010; Alkan *et al.*, 2006). A fermentação em estado sólido (FES) foi definida como o processo de fermentação que envolve a matriz sólida e é realizado em ausência ou quase ausência de água, porém o substrato deve possuir umidade suficiente para dar suporte ao crescimento e ao metabolismo do micro-organismo (Singhania *et al.*, 2009). Uma das principais características da FES é a utilização de substratos com baixa atividade de água. Somente as leveduras e os fungos filamentosos, baseando-se na classificação teórica, seriam micro-organismos capazes de se desenvolver na FES (Pandey, 2003).

Os biorreatores de leito fixo apresentam uma configuração promissora, pois permitem analisar empiricamente a evolução global do processo e determinar parâmetros no controle de temperatura e umidade do meio sólido. Além disso, também é possível estudar fenômenos de transferência de calor, massa e difusão de oxigênio (Durant, 2003).

Com base no exposto anteriormente, o presente trabalho tem como objetivo geral estudar a produção e caracterização parcial de lipase por fungo *Penicillium brevicompactum* por fermentação estado sólido em biorreator de leito fixo, utilizando como substratos farelo de arroz e farelo de soja.

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 configurações de biorreatores para este tipo de fermentação e aspectos gerais relacionados à purificação de enzimas e utilização destas como catalisadores em reações específicas.

2.1. ENZIMAS

As enzimas são um grupo de componentes biológicos com atividade intra e/ou extracelular que têm funções catalisadoras de reações químicas ou bioquímicas, sendo parte principal dos processos metabólicos das células. A propriedade metabólica das enzimas as torna adequadas para aplicações industriais, encontrando emprego nos mais diversos processos industriais destacando-se as indústrias farmacêutica e alimentícia (Cowieson *et al.*, 2006). São biocatalisadores altamente requisitados, devido às suas propriedades, executando uma série de transformações de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reação, o que as difere dos catalisadores não enzimáticos. A facilidade de regular a atividade enzimática é mais um ponto positivo na utilização de enzimas. Toda enzima ainda catalisa as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas, comuns em sínteses químicas, devido à sua especificidade (Patel, 2002; Pizarro e Park, 2003).

As enzimas industriais são, em sua maioria, obtidas de micro-organismos (Sharma *et al.*, 2001). As enzimas microbianas são normalmente mais úteis que as enzimas derivadas de plantas e animais, devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, aos altos rendimentos possíveis, à facilidade de manipulação genética, ao fornecimento regular devido à ausência de flutuações sazonais e ao rápido crescimento dos micro-organismos em meios de baixo custo. As enzimas microbianas são também mais estáveis e sua produção é mais conveniente e segura. Contudo, apenas cerca de 2% dos micro-organismos existentes foram testados como produtores de enzimas (Hasan *et al.*, 2006).

2.2. LIPASES

As lipases têm sido definidas como carboxilesterases, que hidrolisam acilgliceróis com ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de dez átomos de carbono (Castro-Ochoa *et al.*, 2005; Bornscheuer *et al.*, 2002; Nini *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2001; Jaeger *et al.*, 1999). Atuam como catalisadores em diversas reações, com alta especificidade, estabilidade e condições reacionais brandas, incluindo as reações de esterificação, transesterificação, lactonização, acilação regioseletiva e aminólise (Foresti e Ferreira 2006; Krishna e Karanth, 2001).

As lipases eram tradicionalmente obtidas de pâncreas de animais. A descoberta foi feita por Claude Bernard em 1856, e anos mais tarde, aumentou o interesse pelas lipases microbianas devido à dificuldade de acesso do material de origem animal. As lipases são originárias de um grande número de bactérias, fungos, plantas e animais, tendo suas propriedades variáveis de acordo com sua procedência. Particularmente, as enzimas microbianas são mais estáveis que as extraídas de plantas e animais, tornando sua produção mais conveniente e segura (Hasan *et al.*, 2006).

As lipases provenientes de micro-organismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, principalmente devido à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato e à facilidade de produção em escala, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial (Hasan *et al.*, 2006). A capacidade de lipases para realizar transformações químicas muito específicas (biotransformações) tornou-as interessantes em alimentos, detergentes, sínteses, cosméticos orgânicos, produtos farmacêuticos e industriais (Treichel *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2008). Contudo, as lipases ainda têm sido pouco empregadas industrialmente, embora sejam estudadas há anos e possam ser produzidas em larga escala. Pesquisas têm sido realizadas com o intuito de otimizar os processos de modificação de óleos e gorduras catalisados por lipases. Essas pesquisas incluem estudos cinéticos, desenvolvimento de biorreatores e imobilização de enzimas (Carvalho *et al.*, 2003).

2.2.1 Lipases microbianas

As lipases microbianas são biocatalisadores de grande valor, devido principalmente a características como: ação sob condições amenas, estabilidade em solventes orgânicos, especificidade ao substrato e região-especificidade. Em 1906, iniciaram-se os estudos sobre produção de lipases utilizando diversos microorganismos como bactérias, fungos e leveduras (Hasan *et al.*, 2006).

Recentemente, o interesse em pesquisas com lipases, principalmente de origem microbiana, tem crescido devido ao seu grande potencial biotecnológico. Como biocatalisadores, as lipases apresentam algumas vantagens importantes sobre os catalisadores clássicos industriais. Efetivamente, suas características de especificidade, regioespecificidade e enantioespecificidade, permitem a síntese de compostos de alta pureza, com um número reduzido de subprodutos e baixa geração de resíduos (Castro-Ochoa *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005; Villeneuve *et al.*, 2000). Contudo, a temperatura de estabilidade é uma das mais relevantes características para aplicação industrial dos biocatalisadores (Treichel *et al.*, 2009a).

Alguns fungos produtores de lipases mais importantes comercialmente são reconhecidos como pertencentes aos gêneros *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp. e *Rhizomucor* sp. A produção de lipases por fungos filamentosos varia de acordo com a composição do meio, condições de cultivo, pH, temperatura, e do tipo de fonte de carbono e nitrogênio empregados. Além disso, as respostas aos fatores ambientais são também diferentes entre as cepas fúngicas, sendo que, para uma determinada cepa o mesmo fator pode estimular a produção, mas para outra pode não afetar, ou até mesmo inibir a produção de lipase (Colen, 2006).

A demanda industrial por novas fontes de lipases com diferentes características catalisadoras estimula o isolamento e seleção de novas cepas. Microorganismos produtores de lipase foram encontrados em diferentes habitats, tais como resíduos industriais, fábricas de transformação de óleos vegetais, laticínios, solo contaminado com óleo e oleaginosas, entre outros (Treichel *et al.*, 2010). Porém, a limitação para a utilização industrial das lipases de origem microbiana tem sido o custo para a sua obtenção, que é determinado pelo rendimento da produção e pela estabilidade da enzima (Xu *et al.*, 2008).

2.2.2 Produção de lipases microbianas

Na busca pela 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).

Do ponto de vista industrial, os fungos são os preferidos como fontes de lipases, pois as enzimas produzidas por eles geralmente são extracelulares, facilitando a sua extração do meio fermentado e também por serem considerados micro-organismos seguros para a aplicação na indústria de alimentos, bebidas e farmacêutica (Mahadik *et al.*, 2002; Burkert, 2002; Burkert *et al.*, 2004).

A literatura reporta que diversos gêneros de fungos filamentosos têm sido estudados como fonte de lipases, por exemplo: *Rhizopus* (Pastore *et al.*, 2003), *Aspergillus* (Mahadik *et al.*, 2002), *Rhizomucor* (Cordova *et al.*, 1998), *Mucor* (Abbas *et al.*, 2003), entre outros.

As 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 realizada utilizando processos de Fermentação em Estado Sólido (FES) ou Fermentação Submersa (FS). Em qualquer situação deve-se empregar meio de cultura que tenha um baixo custo (Lin *et al.*, 2006). 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).

2.3. APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DAS LIPASES

O desenvolvimento dos processos de fermentação durante a última parte do século XX propiciou a produção de enzimas através do uso de cepas selecionadas e tornou possível a obtenção de enzimas purificadas e bem caracterizadas, mesmo em escala industrial. A produção em larga escala permitiu a introdução de enzimas em vários segmentos industriais.

O interesse em pesquisas com lipases, principalmente de origem microbiana, tem crescido devido ao seu grande potencial biotecnológico. Suas características de especificidade, regioselectividade e enantioselectividade permitem a síntese de compostos de alta pureza, com um número reduzido de subprodutos e baixa geração de resíduos. Além disso, os processos enzimáticos requerem procedimentos mais fáceis e baratos, que utilizam temperatura e pressão ambientes, condições que minimizam a degradação de compostos lábeis e evitam o uso de compostos químicos com alto potencial poluente (Castro-Ochoa *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005; Villeneuve *et al.*, 2000). Conseqüentemente, uma considerável atenção vem sendo dada ao uso das lipases em aplicações industriais. A indústria de enzimas como existe hoje é o resultado do rápido desenvolvimento das últimas quatro décadas, graças à evolução das técnicas biotecnológicas.

Inúmeras são as aplicações potenciais de lipases, muitas delas já desenvolvidas em escala industrial. As lipases têm sido freqüentemente utilizadas na resolução de misturas racêmicas, na formulação de detergentes e síntese de biosurfactantes; no tratamento de efluentes, na indústria oleoquímica (bioconversão de óleos e gorduras) para a produção de biodiesel; na indústria agroquímica; na manufatura do couro e papel; na nutrição; na produção de aromas; na formulação de perfumes, fragrâncias e cosméticos; na fabricação de plásticos e fibras sintéticas; na síntese de sedativos e outros fármacos; dentre outras (Cammarota e Freire, 2006; Hassan *et al.*, 2006; Salis *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005).

As lipases também podem ser utilizadas para acelerar os processos de degradação de gorduras em detritos industriais e no tratamento de efluentes. Atualmente, a aplicação de lipases tem sido também sugerida na degradação biológica e remoção de carga lipolítica de efluentes industriais, gerados em frigoríficos e abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral (Gandhi, 1997; Pastore *et al.*, 2003; Rigoni *et al.*, 2003; Mendes e Castro, 2003). Efluentes que contém elevados teores de gorduras apresentam elevada Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). A degradação biológica desses rejeitos é um processo lento, tendo como etapa limitante a liberação de ácidos graxos pelos micro-organismos com atividade lipolítica. Assim, a adição de lipases pode auxiliar na redução do tempo de retenção hidráulica e aumentar significativamente a eficiência do processo (Pereira *et al.*, 2002; Mendes e Castro, 2003).

Tabela 1 - Aplicação de lipases em diferentes indústrias.

INDÚSTRIA	APLICAÇÃO
Laticínios	Hidrólise de gordura do leite
Panificação	Aumento do aroma e da vida de prateleira
Cervejaria	Aceleração da Fermentação em função dos lipídios
Carne	Desenvolvimento do aroma e remoção do excesso de gordura
Farmacêutica	Digestão de óleos e gorduras em alimentos
Médica	Determinação de triglicerídios no sangue
Papel	Tratamento de polpas de celulose
Tratamento de resíduos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas

Fonte: Maldonado, 2006.

2.4. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A fermentação em estado sólido pode ser definida como o processo que envolve sólidos, em ausência ou quase ausência de água livre (Germano, 2000; Pandey, 2003). O micro-organismo pode crescer entre os fragmentos do substrato (dentro da matriz do substrato) ou sobre a superfície do mesmo, consumindo o substrato e secretando metabólitos, dentre os quais as enzimas (Mitchell *et al.*, 2006). Contudo, o substrato deve possuir umidade suficiente para dar suporte ao crescimento e sustentabilidade ao metabolismo do micro-organismo (Germano, 2000; Pandey, 2003)

A fermentação no estado sólido (FES) é uma prática empregada no Oriente há muitos séculos para a obtenção de alimentos fermentados (Pandey *et al.*, 2000). Em meados de 1940 ocorreu uma redução drástica dos estudos envolvendo FES, principalmente devido ao incentivo para a produção da penicilina por Fermentação Submersa (FS) em meio à Segunda Guerra Mundial. Por isso, processos envolvendo Fermentação Submersa tornaram-se modelos em muitos bioprocessos, sendo extensivamente estudados ao longo dos anos. A partir dos anos 70 voltou-se a atenção para FES, devido à publicação de trabalhos referentes à produção de micotoxinas por fungos. Porém, a grande explosão do uso de FES ocorreu a partir dos anos 90 (Pandey, 2003).

No Brasil, a partir de 1986 iniciou-se uma série de pesquisas referentes à utilização de resíduos agroindustriais como substratos em FES para a produção de metabólitos de alto valor agregado como: etanol, proteínas, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, entre outros (Couto e Sanromán, 2006).

Atualmente, devido a suas vantagens sobre a fermentação submersa, a FES vem sendo empregada para a produção de enzimas, aromas, biossurfactantes, biopesticidas, ácidos orgânicos, alimentos fermentados e também para a biorremediação e biodegradação de compostos e detoxificação biológica de resíduos agroindustriais (Pandey *et al.*, 2000).

As principais vantagens do emprego de FES são: altas produtividades, melhor circulação de oxigênio, utilização de resíduos agroindustriais, menores custos na etapa de recuperação e purificação dos metabólitos obtidos, baixo consumo energético, o crescimento dos micro-organismos é muito semelhante ao encontrado no seu habitat natural, entre outros (Couto e Sanromán, 2006). Uma outra vantagem da FES em relação às culturas submersas pode estar relacionada ao custo do processo, tendo em vista sua simplicidade e economia em termos de espaço, meio, equipamentos e energia (Mitchell *et al.*, 2006).

A fermentação em estado sólido é uma tecnologia adequada à produção de enzimas, uma vez que este processo pode ser realizado *in situ* e rejeitos industriais podem ser empregados como fonte de nutrientes para o processo fermentativo (Martins *et al.*, 2008). O substrato é um 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 para a FES (Christen *et al.*, 1997; Pintado *et al.*, 1998; Dominguez *et al.*, 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 como a torta de soja, 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 (Castilho *et al.*, 2000). A matéria orgânica presente nestes materiais 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).

No entanto, o uso de FES apresenta uma série de desvantagens devido à natureza sólida dos substratos, é muito difícil homogeneizar uniformemente o leito e, como resultados, os gradientes de temperatura, água e metabólitos são inevitáveis (Ashley *et al.*, 1999); a ausência de água livre e a baixa condutividade dos substratos levam à dificuldades no controle da concentração de células, pH, temperatura e umidade (Hamidi-esfahani *et al.*, 2007) e às dificuldades de aumento de escala, principalmente associadas com a remoção do calor metabólico gerado pelo crescimento dos micro-organismos (Lekanda e Pérez-correa, 2004).

Tabela 2 - Principais microrganismos e substratos envolvidos na produção de lipases por FES.

Micro-organismo	Substrato	Referências
<i>Fungos</i>		
<i>Aspergillus</i>	torta de óleo de coco	Ramachandran <i>et al.</i> , 2004.
<i>Aspergillus niger</i>	torta de gergelim	Kamini <i>et al.</i> , 1998.
	farelo de trigo	Mahadik <i>et al.</i> , 2002.
<i>Monascus fuliginosus</i>	bagaço de cana	Liu <i>et al.</i> , 1995.
<i>Neurospora sp TT-241</i>	farelo de trigo	Lin <i>et al.</i> , 1996.
<i>Penicillium</i>		
<i>brevicompectum</i>	torta de babaçu	Silva <i>et al.</i> , 2010.
<i>Penicillium camembertii</i>	bagaço de cana	Rivera-Minöz <i>et al.</i> , 1991.
<i>Penicillium restrictum</i>	torta de babaçu	Castilho <i>et al.</i> , 2000.
<i>Penicillium simplicissimum</i>	torta de soja	Di Luccio <i>et al.</i> , 2004.
<i>Rhizopus oligosporus</i>	torta de amêndoa	UI-Haq <i>et al.</i> , 2002
<i>Rhizopus homothallicus</i>	bagaço de cana	Rodriguez <i>et al.</i> , 2006.

As tortas residuais obtidas a partir de processos de extração de óleos são geralmente usadas na indústria de alimentos para ração animal, por possuírem boas quantidades de proteína. A aplicação de torta de girassol, soja, coco, mostarda, palma, algodão, canola, oliva entre outras podem ser utilizadas na FES para a obtenção de enzimas, antibióticos, biopesticidas, vitaminas, etc. Na produção de enzimas, essas tortas são usadas como substratos na FES ou como suplemento do meio de produção, em termos de fonte de carbono e nitrogênio (Ramachandran *et al.*, 2007).

O estabelecimento das relações entre a fisiologia dos micro-organismos e os fatores físico-químicos é o objetivo para o desenvolvimento de modelos adequados. Esses fatores incluem temperatura, pH, aeração, atividade de água e umidade, as

propriedades do meio, natureza do substrato sólido empregado, etc. Entre vários fatores, pode-se citar como relevantes a umidade e a natureza do substrato sólido. A definição da umidade depende do micro-organismo utilizado e também da natureza do substrato. Fungos necessitam menor umidade, 40-60% de umidade pode ser suficiente, mas a seleção do substrato depende de vários fatores principalmente relacionados com o custo e disponibilidade e, portanto, pode envolver a triagem de resíduos agroindustriais diversos (Singhania *et al.*, 2008).

2.4.1 Características da fermentação em estado sólido

No processo de fermentação em estado sólido deve-se levar em consideração alguns aspectos importantes, como a seleção do micro-organismo, a escolha do substrato, a otimização dos parâmetros do processo, o isolamento e a purificação do produto, dentre outros (Pandey, 2003).

Uma das características principais da fermentação em estado sólido é a baixa atividade de água (a_w) do meio. Baseando-se na classificação teórica, em termos de atividade de água, somente fungos e leveduras seriam micro-organismos adequados para fermentação em estado sólido. Culturas de bactérias exigem alta atividade de água e, portanto não seriam adequadas à FES. No entanto, existem relatos que demonstram que bactérias podem ser usadas nestes processos, quando bem controladas e manipuladas (Pandey, 2003).

A água apresenta um papel primordial na FES, pois é a responsável pela difusão de solutos, gases, e metabólitos inibitórios, bem como pela absorção celular. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos relativos à presença da água em FES devem ser constantemente estudados para a avaliação dos efeitos causados no processo. Os efeitos da água na fisiologia fúngica devem ser bem investigados, pois o fluxo de água através da membrana é responsável pela manutenção da pressão intracelular.

A utilização de altos níveis de água na FES diminui a porosidade do meio, o que dificulta a penetração do oxigênio e facilita contaminações por bactérias. Em contrapartida, meios com baixa umidade podem dificultar a acessibilidade dos nutrientes, resultando em um crescimento microbiano reduzido (Gervais e Molin, 2003; Pandey, 2003).

Outras características básicas da FES são (Bianchi *et al.*, 2001; Sato e Sudo, 1999):

- A distribuição microbiana, o crescimento e a formação de produto ocorrem principalmente na superfície sólida;
- O calor gerado durante o crescimento e metabolismo do micro-organismo eleva a temperatura do leito de substrato, causando a redução da umidade do meio;
- Os micro-organismos geralmente utilizados são espécies que podem produzir amilases, com a finalidade de degradar o amido e penetrar dentro do substrato sólido, essas espécies apresentam morfologias diferentes, quanto ao tipo de micélios (aéreas e submersas) com diferentes atividades fisiológicas;
- O cultivo é geralmente estacionário, devido à dificuldade de agitação do meio. A agitação pode causar danos às células, em alguns casos. Nos casos em que é necessária a agitação utilizam-se fermentadores de leito fluidizado, leito fixo e de tambor rotativo.

A principal vantagem da utilização da fermentação em estado sólido se dá na utilização de substratos com baixo valor agregado. Além desta, existem outras vantagens que estão resumidas a seguir (Sato e Sudo, 1999; Palma *et al.*, 2000; Germano, 2000; Bianchi *et al.*, 2001; Pandey e Soccol, 2001; Gervais e Molin, 2003):

- Pode-se adicionar nutrientes suplementares ao substrato sólido;
- O volume de meio reacional é reduzido, implicando em um menor investimento capital em biorreatores;
- Os esporos dos micro-organismos podem ser utilizados diretamente na inoculação, evitando etapas prévias como pré-cultivos que envolvem grandes volumes de meio e tanques para seu desenvolvimento;
- O crescimento dos fungos ocorre em condições similares às do seu habitat natural;
- O fato de o meio de cultivo apresentar baixa atividade de água reduz o problema de contaminações, especialmente por bactérias;

- A aeração do meio é facilitada devido ao maior espaço entre as partículas e pela difusão do oxigênio na água utilizada para umidificar o meio;
- Altos rendimentos quanto à formação de metabólitos, e simplicidade nas etapas de purificação, pois os produtos estarão concentrados no líquido da extração.

Embora a fermentação em estado sólido tenha se mostrado extremamente vantajosa quanto a custos e facilidades, esta também apresenta alguns problemas que dificultam a sua aplicação (Sato e Sudo, 1999; Germano, 2000; Bianchi *et al.*, 2001; Pandey e Soccol, 2001). A fermentação em estado sólido normalmente é restrita a micro-organismos capazes de crescer em sistemas com baixa umidade. No entanto, já existem alguns relatos de processos de FES utilizando bactérias (Pandey, 2003).

Outro ponto complexo é a dificuldade na determinação do crescimento microbiano. A biomassa não pode ser determinada de forma direta, pois os micro-organismos se encontram intimamente ligados ao substrato. Estudos cinéticos do crescimento microbiano na FES descrevem um baixo nível de desenvolvimento, normalmente associado a fatores como a heterogeneidade do substrato, complexidade da interação micélio/substrato e a determinação indireta da biomassa (Soccol *et al.*, 1994; Germano, 2000).

2.4.2 Produção de lipase por fermentação em estado sólido

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).

A produção de lipase por FES, em alguns casos, mostra-se altamente dependente da relação de carbono/nitrogênio e do tipo de fonte de carbono do meio (Gombert *et al.*, 2000; Dominguez *et al.*, 2003), por isso estudos utilizando diferentes fontes suplementares de carbono e nitrogênio, com o objetivo de enriquecer o meio e induzir a síntese da lipase, vêm sendo desenvolvidos. O uso de triglicérides como fonte de carbono é adequado para crescimento celular e produção de enzima, embora a indução da biossíntese da lipase em presença de ácidos graxos livres ou

triglicerídeos seja controverso (Freire *et al.*, 1997b). A presença de materiais que apresentam lipídios no meio de cultura usualmente aumenta em muito os níveis de atividade lipásica (Dominguez *et al.*, 2003).

As lipases microbianas demonstram um enorme potencial biotecnológico, por apresentarem fatores peculiares como estabilidade em solventes orgânicos, não requererem cofatores, possuem especificidade pelos substratos e exibem uma alta enâncioesletividade e enâncioespecificidade (Elibol e Ozer, 2000).

Estudos mostram que as lipases microbianas produzidas por FES se mantêm estáveis na faixa de pH entre 5,0 a 8,0 e apresentam maior atividade na faixa de temperatura de 30 a 40°C, no entanto, algumas lipases têm mostrado níveis de estabilidade consideráveis mesmo em temperaturas extremas, como 5 e 60°C (Freire *et al.*, 1997a; Kamini *et al.*, 1998; Maia *et al.*, 1999; Ferrer *et al.*, 2000; Benjamin e Pandey, 2001; Pastore *et al.*, 2003). No entanto, algumas lipases produzidas através de fermentação em estado sólido são enzimas sensíveis quanto à presença de proteases e aumentos no pH do meio, tendo sua atividade comprometida por estes fatores (Gombert *et al.*, 1999; Benjamin e Pandey, 2001).

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 a produção de lipase e crescimento microbiano, as fontes de carbono mais usuais são os carboidratos, os ácidos orgânicos, os gliceróis, outros álcoois e ácidos graxos (Hadeball, 1991 apud Gonçalves, 2007 apud Silva, 2010).

Vários trabalhos têm reportado o uso de resíduos proveniente da agroindústria na produção de lipase por fermentação em estado sólido. Estes são utilizados como fonte de nutrientes para o crescimento microbiano. Resíduos como os da indústria de óleos vegetais (óleo de oliva, óleo de soja, óleo de babaçu, óleo gergelim, óleo de semente de girassol, óleo de coco) (Cordova *et al.*, 1998; Kamini *et al.*, 1998; Gombert *et al.*, 1999; Palma *et al.*, 2000) e subprodutos como farelo de casca de trigo (Bertolin *et al.*, 2001; Benjamin e Pandey, 2001; Mahadik *et al.*, 2002), farelo de cevada (Dominguez *et al.*, 2003), farelo de arroz (Rao *et al.*, 1993), entre outros. Recentemente, Silva (2009) estudou a produção e a caracterização de

lipases de *Penicillium verrucosum* e *Penicillium brevicompactum* através de Fermentação em Estado Sólido (FES), utilizando torta de babaçu e farelo de mamona como substratos utilizando reatores de pequena escala.

2.5. PRÉ-PURIFICAÇÃO DAS LIPASES

A etapa de purificação é importante para a obtenção de enzimas com alto grau de pureza e com maiores níveis de atividade enzimática. O processo de purificação é fundamental na obtenção e aplicação industrial de uma enzima. Após a fermentação, a enzima encontra-se no meio contendo uma série de outros compostos que não são de interesse (Maldonado, 2006).

Diversas técnicas têm sido empregadas para a purificação de lipase, 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 obtenha enzimas com maior poder de catálise (Gupta *et al.*, 2004; Saxena *et al.*, 2003).

A metodologia com a adição de sulfato de amônio consiste em uma das técnicas mais comuns e simples para a concentração de proteínas, para a separação das mesmas dos outros compostos do meio. O sal é adicionado ao sobrenadante até uma porcentagem de saturação em que a enzima de interesse seja 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 com tampão adequado, utilizando-se um volume de aproximadamente duas vezes o volume do precipitado (Borzani *et al.*, 2001).

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 da obtenção de uma enzima. 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 em função do processo de purificação (Maldonado, 2006).

2.6. CARACTERIZAÇÃO DE LIPASES

Diversos pesquisadores têm estudado o efeito de diversos fatores na atividade e estabilidade de lipases brutas e purificadas. Fatores como pH, temperatura, efeito de íons metálicos, solventes orgânicos, detergentes/surfactantes, e outros inibidores podem aumentar ou suprimir a atividade das lipases. Além disso, por ser uma enzima versátil, a lipase apresenta variadas especificidades aos substratos reacionais. A caracterização bioquímica das lipases determina a adequação da enzima para a aplicação em diferentes processos industriais (Hasan *et al.*, 2006).

2.6.1 Especificidade pelo substrato

A especificidade pelo substrato de lipases em reações de esterificação é importante para obter um melhor entendimento da relação estrutura-função e melhorar os parâmetros reacionais, proporcionando maiores conversões e aplicabilidade (Peter e Preda, 2002). Dependendo das características de especificidade da lipase, esta pode se tornar atraente para diferentes aplicações em áreas industriais potenciais (Sun e Xu, 2009).

As lipases são capazes de catalisar reações com uma ampla faixa de substratos, mas as taxas de reação variam amplamente com a estrutura das moléculas do substrato. As diferentes afinidades de uma molécula de lipase por diferentes álcoois e ácidos graxos, pode ser entendida em termos da energia de ligação que é liberada quando um substrato se liga ao sítio ativo das lipases. Poucos dos muitos substratos que se ligam ao sítio ativo podem liberar uma quantidade suficiente de energia de ligação para ocasionar uma mudança na conformação da

lipase para uma forma mais eficiente cataliticamente (Abbas e Comeau, 2003). A especificidade das lipases é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação enzima-substrato (hidratação estérica e interações hidrofóbicas) (Rigo, 2009).

2.6.2 Estabilidade térmica

A termoestabilidade de um biocatalisador permite o uso de maiores temperaturas operacionais, o que é claramente vantajoso devido à maior reatividade (maiores taxas reacionais, menores restrições difusionais), maior estabilidade, maior rendimento de processo (solubilidade dos substratos e aumento dos produtos e deslocamento favorável do equilíbrio em reações endotérmicas) e risco reduzido de contaminação microbiológica (Hasan *et al.*, 2006). Conseqüentemente, a estabilidade térmica é uma característica desejável para as lipases (Sharma *et al.*, 2001).

Enzimas termoestáveis podem ser obtidas a partir de organismos mesofílicos e termofílicos; até psicrófilos podem produzir algumas enzimas termoestáveis. Enzimas termoestáveis obtidas a partir de fontes microbianas são altamente vantajosas para aplicações biotecnológicas, já que podem ser produzidas com baixos custos e exibem alta estabilidade. Nos últimos anos, há uma grande demanda por enzimas termoestáveis na área industrial (Hasan *et al.*, 2006).

A estabilidade térmica de uma lipase está obviamente relacionada com a sua estrutura (Sharma *et al.*, 2001). Em baixos teores de água, como é o caso das enzimas liofilizadas, as moléculas de enzima apresentam certa rigidez conformacional, que é responsável por algumas conseqüências interessantes observadas em solventes orgânicos anidros. Uma dessas conseqüências é a maior estabilidade quando submetida a temperaturas elevadas, já que a conformação rígida é mais estável que a flexível (observada na forma totalmente hidratada da enzima). Além da rigidez, outra razão para o aumento da estabilidade é que vários processos covalentes envolvidos na inativação irreversível de proteínas, como a desaminação, hidrólise peptídica e decomposição da cistina, requerem água. Esses

processos irreversíveis são também extremamente lentos em baixos teores de água (Gupta, 1992).

Outra propriedade importante a ser avaliada é a estabilidade ao longo do período de armazenamento em baixas temperaturas (Menoncin *et al.*, 2009). O estudo da estabilidade da enzima em baixas temperaturas indica a melhor temperatura de estocagem da enzima para aumentar a sua vida de prateleira.

2.7 A IMPORTÂNCIA INDUSTRIAL DOS ÉSTERES

Os ésteres são considerados uma das classes mais importantes de compostos orgânicos e podem ser obtidos através de diferentes metodologias: 1) reação entre álcoois e ácidos carboxílicos (esterificação) com a eliminação de água; 2) reações de interesterificação, onde ocorrem trocas de grupos acilas entre ésteres e ácidos carboxílicos (acidólise), entre ésteres e álcoois (alcoólise) ou gliceróis (glicerólise) e entre ésteres (transesterificação); 3) através de fontes naturais por destilação e extração com solventes adequados ou por processos químicos e, mais recentemente, por biocatálise (Adachi e Kobayashi, 2005; Güvença *et al.*, 2002; Chowdary *et al.*, 2001; Alvarez-Macarie e Baratti, 2000).

A produção biotecnológica de ésteres utilizando lipases tem recebido grande atenção devido às condições de reações brandas (temperatura, pH e pressão) envolvidas, o elevado grau de pureza alcançado, bem como a aceitação destes produtos na indústria de alimentos (Martínez-Ruiz *et al.*, 2008).

Os ésteres de sacarose, por exemplo, são conhecidos como bons emulsificantes no campo da indústria alimentar, farmacêutica e cosmética; o palmitato de *isopropila* é usado em preparações medicinais para cosméticos, nas quais é necessária uma boa absorção do produto através da pele. Os ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, como os oleatos, palmitatos e linolenatos são os principais constituintes do biodiesel (Hazarika *et al.*, 2002).

Os processos enzimáticos apresentam inúmeras vantagens em relação aos processos químicos industriais. As enzimas utilizadas nos setores industriais são quase em sua totalidade produzidas por micro-organismos (Sharma *et al.*, 2001;

Hasan *et al.*, 2006). Por isso, a síntese enzimática do oleato de etila e de outros ésteres do ácido oléico em solventes orgânicos têm sido estudada utilizando-se lipases de pâncreas de porco e de várias fontes microbianas, como as de *Mucor miehei*, *Chromobacterium viscosum*, *Rhizopus oligosporus*, *R. delemar*, *R. arrhizus*, *Candida rugosa*, *Penicillium simplicissimum* e *Pseudomonas cepacia* (*Burkholderia cepacia*) (Bucalá *et al.*, 2006; Foresti e Ferreira, 2005; Foresti *et al.*, 2005; Hazarika *et al.*, 2002; María *et al.*, 2002).

A transesterificação catalisada por lipases é aplicável aos óleos vegetais refinados e brutos. A síntese pode envolver o emprego de resíduos de gorduras de frituras, sebo e outros resíduos de gorduras e diversos álcoois, como metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol e isobutanol como substratos. A mínima concentração de água no meio reacional pode ter impacto positivo sobre a produtividade de biodiesel, pois a camada de hidratação necessária à atividade enzimática é mantida. A concentração de ácidos graxos livres no óleo pode ser muito maior do que a rota química catalisada por álcalis (Ranganathan *et al.*, 2008).

Gorduras contendo triacilgliceróis e ácidos graxos livres são facilmente convertidos em biodiesel porque a enzima catalisa as reações de transesterificação, podendo ser efetuada na presença ou em meios isentos de solventes orgânicos. Normalmente, em sistemas contendo solvente orgânico, as lipases catalisam a conversão de óleo em biodiesel quando a alíquota global de álcool é adicionada no início do processo (Ranganathan *et al.*, 2008).

2.8. BIORREATORES E FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Os biorreatores mais comumente utilizados em processos em estado sólido são os biorreatores em bandeja, tambor rotativo, de leito fixo e de leito fluidizado (Bianchi, 2001; Robinson e Nigam, 2003).

Na aplicação de biorreatores em escala industrial e piloto os maiores problemas identificados estão relacionados à transferência de calor e massa, causados por compactação do meio, criação de caminhos preferenciais, que por sua vez levam à aeração deficiente. No entanto, estes problemas podem ser minimizados através de estratégias como a circulação de ar ao redor do leito do substrato e

através deste e a utilização de diferentes estratégias de agitação do leito. No entanto, a questão da agitação deve ser examinada com cautela, uma vez que fungos que não apresentem septo nas hifas podem ser pouco resistentes à agitação mecânica (Durand, 2003).

Os reatores mais simples são os reatores em bandeja e os de colunas de leito fixo. Em escala de laboratório comumente se utilizam placas de Petri, erlenmeyers de boca larga, béqueres, e outros tipos de recipientes que promovam uma boa superfície de contato entre o meio e o ar atmosférico. Usualmente em escala reduzida somente se controla a temperatura do ambiente no qual o frasco contendo o meio inoculado é incubado. Este tipo de estratégia é apropriada para avaliações iniciais sobre os tipos de micro-organismos e meios adequados ao processo de interesse, por ser prática e de fácil manuseio para um grande número de experimentos (Durand, 2003).

2.8.1 Biorreator tipo bandeja

O biorreator tipo bandeja é a configuração mais simples, onde uma fina camada de substrato mais micro-organismo são incubados em uma câmara com controle de umidade e temperatura. Esta tecnologia pode ser facilmente escalonada, uma vez que o número de bandejas pode ser aumentado para atingir a capacidade de processamento exigida pelo processo. Embora esta tecnologia venha sendo amplamente usada na indústria, principalmente no Japão para a produção de molho de soja fermentado, a mesma apresenta o inconveniente de requerer uma ampla área dentro da indústria para o desenvolvimento do processo.

2.8.2 Biorreatores de leito fixo

Os biorreatores de leito fixo também são bastante utilizados em escala laboratorial. Neste tipo de biorreator, o meio pré-inoculado é acondicionado em colunas pequenas que são incubadas em banho termostático. Ar úmido é forçado através do leito, buscando expandir o mesmo, aumentando a superfície de contato e assim propiciando uma melhor transferência de calor. O ar utilizado deve ser

saturado em água para minimizar a evaporação. Este sistema facilita o acompanhamento do crescimento microbiano através de técnicas de respirometria (Sato e Sudo, 1999; Mitchell *et al.*, 2003a). Este equipamento também apresenta outras vantagens como o baixo custo e uso relativamente fácil (Durand, 2003).

Com relação aos biorreatores de leito fixo, são apresentados vários trabalhos, os quais usam em média 1,5 a 5kg de substrato. Roussos *et al.* (1993) apresentaram um projeto de biorreator para operar em escala piloto, com capacidade máxima de 40kg de substrato. Virtaten *et al.* (2008) usaram um biorreator de leito fixo com capacidade para 40kg de substrato na produção de biopesticidas. A literatura apresenta inúmeras aplicações de biorreatores de leito fixo para a obtenção de bioprodutos em FES. No entanto, todos os trabalhos foram realizados em escala de laboratório, usando no máximo 40kg de substrato. Mazutti *et al.*, (2009), estudou a cinética da produção de inulinase em biorreator de leito fixo, utilizou 2kg de bagaço de cana seca.

Em ambos os casos, não se encontram problemas referentes ao acúmulo de calor no interior do leito, devido ao pequeno volume de meio normalmente utilizado. No entanto, em escala piloto ou industrial, os biorreatores de leito fixo apresentam como desvantagem a dificuldade de se obter um crescimento microbiano uniforme e na dissipação do calor (Robinson e Nigam, 2003). Assim, a formação de gradientes de temperatura durante a fermentação é inevitável e outras estratégias devem ser utilizadas.

2.8.3 Biorreator de tambor rotativo

Nos biorreatores de tambor rotativo, o uso da rotação promove a agitação e aeração do meio, sendo que estes biorreatores podem ainda ser utilizados em processos contínuos. Durante a fermentação é possível se fazer uma pulverização de água na superfície do leito, permitindo desta forma o uso de ar seco para remover o calor gerado durante a fermentação. No entanto, no substrato pode haver problemas de aglomeração ou atrito. O uso da agitação pode promover e facilitar a transferência de massa e calor e uma distribuição mais uniforme dos nutrientes (Sato e Sudo, 1999; Robinson e Nigam, 2003).

Em um biorreator de tambor rotativo, a transferência de calor e, portanto, a remoção do calor metabólico, é limitada pela evaporação de água das partículas de substrato e pela perda de calor por convecção através das paredes do biorreator para o ambiente. Quanto maior a escala do processo fermentativo, a remoção de calor por evaporação torna-se mais importante que a perda de calor por convecção (Mitchell *et al.*, 2003).

Uma das maiores vantagens dos biorreatores do tipo tambor rotativo é a possibilidade de adição de água durante a fermentação, por exemplo, pela aspensão de uma fina camada sobre o substrato durante o movimento de rotação do tambor. Isto implica dizer que a remoção de calor por evaporação pode ser usada como o principal mecanismo de retirada de calor do meio sem limitar o crescimento microbiano devido à diminuição da umidade do meio.

2.8.4 Biorreator de leito fluidizado e de leito agitado

A principal diferença entre os biorreatores do tipo tambor rotativo e os biorreatores de leito fluidizado e de leito agitado é a maneira pela qual ocorre o sistema de aeração do leito. Em biorreatores de leito fluidizado e reatores de leito agitado o ar é injetado diretamente no leito contendo o substrato, como ocorre nos biorreatores de leito fixo, melhorando consideravelmente a área de contato entre o gás e as partículas sólidas, enquanto que no biorreator de tambor rotativo o ar é injetado no *headspace* do biorreator. No caso de biorreatores do tipo leito fluidizado, os mesmos não podem ser assumidos perfeitamente agitados, mas a remoção de calor por convecção é efetiva, de maneira que o balanço de energia é desconsiderado na grande maioria das vezes, limitando-se somente ao balanço de massa, especificamente, o balanço para água (Mitchell *et al.*, 2003). No caso de biorreatores de leito agitado, diversos mecanismos de agitação têm sido empregados como alternativas para obter uma melhor uniformização das propriedades do leito. Mitchell *et al.* (2000) apresentam várias configurações diferentes de biorreatores de leito agitado, onde, na grande maioria dos casos, a agitação é realizada pelo uso de pás dispostas no centro do biorreator.

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 de oxigênio são iguais em todo o leito. No entanto, com o decorrer do processo, surgem problemas na difusão de oxigênio e transferência de calor, por compactação e encolhimento do meio. O calor e gases gerados nas reações 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; Bianchi, 2001; Raghavarao *et al.*, 2003; Durand, 2003; Robinson e Nigam, 2003).

Poucas melhorias têm sido desenvolvidas em termos de biorreatores para FES. Na maioria dos casos, o escalonamento se baseia em procedimentos empíricos e na mecanização de fermentadores de leito ou bandejas, utilizando-se agitadores mecânicos planetários ou diferentes tipos de tambores rotativos (Durand, 2003). No entanto, avanços significativos têm sido realizados no sentido de desenvolver abordagens quantitativas da transferência de calor e massa em biorreatores de FES (Mitchell *et al.*, 2003a) e desenvolvimento de modelos matemáticos de biorreatores e de crescimento microbiano (Von Meien e Mitchel, 2002; Mitchell *et al.*, 2003).

2.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A revisão bibliográfica apresentada nesse capítulo permitiu concluir que as lipases microbianas apresentam um grande potencial em aplicações biotecnológicas. O conhecimento das características da lipase produzida e as variáveis que envolvem o processo de obtenção da enzima como: condições de extração, pH, temperaturas ótimas de atuação, estabilidade quando armazenadas em altas e baixas temperaturas e a especificidade pelo substrato são de extrema importância para determinar suas possíveis aplicações.

A busca pela redução dos custos de produção de lipases faz com que aumente as investigações sobre substratos e principalmente formas de fermentações para que a obtenção da enzima se torne viável economicamente. Atualmente, os processos de fermentação em estado sólido vêm ganhando espaço e a atenção de pesquisadores por apresentar vantagens econômicas perante a fermentação submersa, porém são necessários estudos mais aprofundados no que se refere ao comportamento do processo em aumento de escala e emprego de biorreatores.

O aumento de escala, por sua vez, requer o desenvolvimento de modelos matemáticos confiáveis que possam ser utilizados como ferramentas de projeto, otimização e controle do processo. A escolha certa da configuração do biorreator, obrigatoriamente, determinará o bom desenvolvimento deste tanto na escala laboratorial como na industrial.

Contudo, é de grande importância a execução de estudos na busca de processos e condições aprimoradas para maior conhecimento do processo em grande escala para a produção de lipases em biorreatores, visando um maior rendimento em pouco tempo e utilizando meios de baixo custo que disponibilizem um resultado breve.

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 a caracterização de lipases extracelulares obtidas por fermentação em estado sólido (FES) utilizando resíduos agroindustriais como substratos e o fungo *Penicillium brevicompactum*.

3.1 MATERIAIS

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

- Acetona (Quimex);
- Biftalato de Potássio (Nuclear);
- Butanol seco (máx. 0,005% H₂O) (Merck);
- Casca de arroz (Josapar, Pelotas, RS);
- Casca de soja (Olfar, Erechim, RS);
- Etanol 95% (Quimex);
- Farelo de arroz (Josapar, Pelotas, RS);
- Farelo de soja (Olfar, Erechim, RS);
- Fenolftaleína (Nuclear);
- Fosfato de sódio (Vetec);
- Hidróxido de sódio (Nuclear);
- Meio PDA (Batata, Dextrose, Agar) (Acumedia);
- Metanol seco (máx. 0,005% H₂O) (Merck);
- *n*-propanol (Vetec);
- Óleo de oliva (Arisco), óleo de soja (Soya), óleo de côco;
- Sulfato de amônio (Synth);
- Tween 80 (Vetec);
- Uréia (Synth).
-

3.2 EQUIPAMENTOS

Os principais equipamentos utilizados no decorrer deste trabalho foram:

- Agitador orbital (Marconi MA-410);
- Agitador magnético (Fisatom);
- Balança analítica (Bel Engineering);
- Biorreator de leite fixo;
- Câmara de fluxo laminar (Pachane);
- Dessecador com sílica (Vidralabor, Thermex);
- Estufa com circulação de ar (Fanem, modelo 320SE);
- Freezer -80°C (Hitachi);
- Germinadora para incubação (Tecnal TE-401);
- Liofilizador (Edwards Modulyo);
- Microondas Philco (modelo PMW 110);
- Microscópio (Leica);
- Medidor de pH digital (Gehaka, modelo PG2000);
- Mixer manual (Black e Decker);
- Titulador automático (Mettler Toledo DL 50 Graphix).

3.3 MÉTODOS

A seguir serão apresentadas detalhadamente as metodologias experimentais empregadas para obtenção de lipases extracelulares com atividade de esterificação, através de fermentação em estado sólido (FES) investigando diferentes resíduos agroindustriais como substratos. De forma sucinta, estão apresentadas as etapas realizadas visando o estudo da produção da lipase com atividade de esterificação:

a) Ensaio para a produção da lipase:

- Avaliação da produção da lipase e da suplementação do meio com resíduos agroindustriais (ureia, melão e óleo de soja), com atividade de esterificação através da cepa de *Penicillium brevicompactum*.
- Concentração do extrato enzimático com sulfato de amônio:

b) Produção de lipase em biorreator de leite fixo:

- Avaliação da produção de lipase com atividade de esterificação do extrato enzimático bruto.
 - Concentração do extrato enzimático bruto com sulfato de amônio.
- c) Caracterização bioquímica da lipase com atividade de esterificação:
- Determinação da estabilidade da lipase bruta liofilizada, em termos de altas temperaturas (40,50 e 60°C).
 - Determinação da estabilidade da lipase bruta liofilizada, em termos de baixas temperaturas (4°C, -10°C e -80°C).
 - Avaliação da especificidade dos extratos enzimáticos com atividade de esterificação em:
 - Ácidos: láurico (C12:0) , oléico (C18:1) e butírico (C4:0).
 - Álcoois: Metanol, etanol, n-propanol e butanol.
 - Avaliação da especificidade dos extratos enzimáticos com atividade de esterificação em diferentes triglicerídeos: óleo de oliva, óleo de soja e óleo de coco.

3.3.1 Micro-organismo

O fungo *Penicillium brevicompactum* foi isolado previamente por Freire (1996) a partir do flotado da fermentação natural de amêndoas de babaçu. Este fungo foi selecionado como bom produtor de lipase utilizando-se metodologias de seleção em meio sólido e líquido, descritos na literatura (Freire, 1996).

3.3.2 Manutenção da cepa

Para a manutenção, as cepas do fungo foram crescidas em meio (PDA-*potato dextrose agar*) durante sete dias a 30°C e então as colônias foram raspadas através de 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 esporos foi transferida para criotubos de 1,5mL estéreis e conservada a -18°C. A propagação de esporos para posterior fermentação foi feita por um período de 7 dias a 27,5°C.

3.3.3 Fermentação em estado sólido (FES)

Nessa etapa as cepas foram inoculadas em farelo de arroz e casca de arroz, farelo de soja e casca de arroz, farelo de soja e casca de soja, baseando-se nas condições estabelecidas pelo planejamento de experimentos. Após a fermentação, avaliou-se a atividade de esterificação no extrato bruto e extrato precipitado, ambos liofilizados.

3.3.3.1 Inóculo

O meio para a produção do inóculo do fungo constituiu-se de frascos Erlenmeyer de 500mL contendo 100mL de meio (BDA). O meio esterilizado foi inoculado com 0,5mL de suspensão de esporos obtida a partir de estoque, sendo então incubado por sete dias a 27,5°C. A coleta dos esporos foi realizada adicionando-se 10mL de solução aquosa 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 a sua utilização, por um tempo máximo de 15 dias. Para a contagem de esporos, 1mL da suspensão era retirado asépticamente e diluído de 10 a 1000 vezes em solução aquosa estéril de Tween 80. A suspensão resultante foi transferida para a câmara de Neubauer (Prolab) para a 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 Substratos

Os substratos utilizados como suporte no processo fermentativo para a produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES) foram: farelo de soja (FS) e casca de soja (CS), que consiste no resíduo da extração do óleo de soja, obtido após a prensagem de grãos e extração com solventes, doado por uma indústria de óleo de soja local (Olfar, Erechim, RS), o farelo de arroz (FA) e a casca de arroz (CA), que é um subproduto do processo de beneficiamento do arroz, obtido em uma indústria de parboilização de arroz (Josapar, Pelotas, RS).

Todos os substratos foram estocados a -15°C e foram utilizados como recebidos, sem tratamento prévio.

3.3.3.3 Estudo da produção de lipases

Neste item será apresentada a metodologia utilizada para a produção de lipases em béqueres e em biorreator de leito fixo utilizando resíduos agroindustriais como farelo de arroz e casca de arroz, farelo de soja e casca de soja por fermentação em estado sólido.

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 conseqüente redução de custos (Rodrigues e lemma, 2005).

Dois planejamentos fatoriais 2^2 foram conduzidos e as amostras foram analisadas por 72 horas. A análise de superfície de resposta foi utilizada para avaliar a influência das variáveis nas condições de cultivo para a produção de lipases em fermentação em estado sólido. Esta etapa do trabalho foi realizada em béqueres.

Nos planejamentos experimentais 1 e 2, farelo de arroz foi utilizado como substrato. A temperatura foi fixada em 30°C e a concentração de esporos em $1,5 \times 10^7$ esporos/(g farelo seco). Cabe ressaltar que a diferença entre os dois planejamentos é suplementação com óleo de soja no planejamento 2.

Tabela 3 - Variáveis e níveis estudados nos planejamentos 1 e 2.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Melaço (%)	0	2	4
Ureia (%)	0	1	2

3.3.4 Avaliação da produção de lipase por fermentação em estado sólido (FES) em béqueres

O farelo sem classificação prévia foi utilizado nas fermentações conduzidas por 72 horas em béqueres de polipropileno de 600mL tampados com manta acrílica hidrofóbica, contendo 10g de farelo seco com umidade fixada de 80% com água destilada. Após esterilização (121°C, 15min) os béqueres foram inoculados e incubados em câmara climatizada (Tecnal TE-410). Para a inoculação do fungo, utilizou-se 2,5mL de inóculo com concentração de esporos ajustada para obter-se $1,5 \times 10^7$ esporos/g de farelo seco, incubando-se a 30°C.

3.3.4.1 Suplementação do meio

Os suplementos testados foram: óleo de soja, melão de cana de açúcar pré-tratado e uréia, nas proporções descritas conforme o planejamento de experimentos.

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

O volume de emulsão adicionado ao farelo foi padronizado em 2mL. 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 fixada em 80%. Os béqueres foram então fechados com manta acrílica e autoclavados a 121°C por 15min.

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

As fermentações foram realizadas em triplicata com a retirada das amostras após 72 horas de fermentação.

3.3.5 Estudo da produção de lipase em biorreator de leito fixo

As fermentações foram realizadas em biorreator de leito fixo com capacidade útil de 4kg de casa de arroz seca. O biorreator consiste de um cilindro de 34cm de diâmetro e 50cm de altura. A Figura 1 apresenta um diagrama esquemático do biorreator de leito fixo. O biorreator foi conectado a duas estratégias de aeração: umidificador de ar e/ou secador de ar.

1) O umidificador de ar: fornece ar com umidade relativa entre 95-100%, consiste de um cilindro de PVC disposto horizontalmente antes da entrada do ar no biorreator. O ar seco fornecido por um compressor de ar foi bombeado diretamente dentro do umidificador usando um difusor, onde o ar permanecia em contato com a água por um tempo suficiente para que fosse obtido ar saturado a uma temperatura de 30°C.

2) O secador de ar: consistia de uma resistência disposta antes da entrada de ar no biorreator. O ar seco, também fornecido por um compressor de ar, foi bombeado para dentro da resistência em (30°C). Independente do tipo de ar injetado para dentro do biorreator, o mesmo percorria todo o leito, até sua saída no topo.

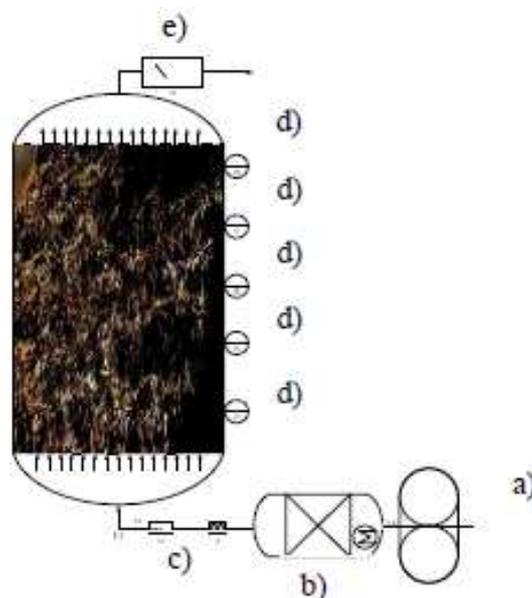


Figura 1 - Diagrama esquemático do biorreator de leito fixo: a) compressor; b) umidificador; c) controle de vazão, temperatura e umidade; d) sensores de temperatura; e) medidor de CO₂, temperatura e umidade.

Foram realizadas três fermentações no biorreator com diferentes substratos sendo que a primeira consistiu de uma mistura de 1kg farelo de arroz e 1kg casca de arroz, 68 horas de fermentação. A segunda fermentação foi realizada utilizando 2kg de farelo de soja e 2kg de casca de arroz, 48 horas de fermentação e a terceira utilizou uma mistura de 2kg de farelo de soja e 2kg de casca de soja, em 48 horas de fermentação. Todos os experimentos foram realizados com suplementação de óleo de soja (3%), melação de cana de açúcar pré-tratado (4%) e ureia (2%). A umidade dos substratos foi fixada em 55% (Base seca - p/p) e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Em seguida, 1000mL de inóculo foi adicionado ao meio e deu-se início à fermentação.

3.3.5.1 Monitoramento da temperatura

As temperaturas de entrada (0cm) e saída do biorreator (40cm), bem como as temperaturas ao longo da altura do biorreator (10, 20, e 30cm), foram constantemente monitoradas através de um sensor de temperatura PT100 (NOVUS, Brasil).

3.3.5.2 Monitoramento da produção de CO₂

Também foi avaliado o metabolismo respiratório do micro-organismo, determinando a produção de CO₂, de modo que o ar de saída do biorreator foi analisado por um sensor de CO₂ gasoso baseado na refração das ondas de infravermelho (CARBOCAP GMT220, VAISALA, Inc, Finlândia) com sinal de saída linearmente convertido para 4-20mA. O sensor foi conectado à placa de aquisição de dados (FIELDLOGGER NOVUS, Brasil), com um intervalo de 1 minuto entre cada aquisição.

3.3.5.3 Processo de extração da enzima

Após a fermentação em biorreator de leito fixo, foram retiradas amostra do farelo fermentado em diferentes alturas, divididas em topo, meio e fundo.

Em seguida, o processo de extração foi realizado em erlenmeyeres de 250mL, onde ao meio fermentado era adicionado tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0, na razão 1:5 (10g de farelo fermentado para 50mL de tampão fosfato). Estes frascos foram incubados por 20min a 35°C e 200rpm e m agitador orbital. Após a

incubação, as mesmas 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 metodologia descrita posteriormente. Todas as análises de atividade foram realizadas em triplicata. A determinação de atividade enzimática deve ocorrer em sistema com baixo conteúdo de umidade, por isso foi necessário realizar a desidratação do extrato aquoso obtido após o processo de extração da enzima da matriz sólida, no qual foi empregado o processo de liofilização.

Os extratos foram dispostos em camadas de um centímetro de espessura em placas de Petri e então submetidas ao congelamento a -80°C por 24 horas 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. As amostras secas foram acondicionadas em frascos de vidro, lacrados, codificados, vedados e armazenados.

3.3.6 Determinação da atividade de esterificação

A atividade de esterificação do extrato enzimático bruto liofilizado foi quantificada através da reação de síntese do ácido oléico e etanol (razão molar 1:1) (Langone *et al.*, 2002; Bernardes *et al.*, 2007, modificado). A reação foi conduzida a 40°C , 150rpm por 40min. Esta foi iniciada pela adição do extrato liofilizado (0,1g) ao meio reacional, em frascos de vidro tampados e mantidos em agitador orbital. Foram retiradas alíquotas (triplicata) de $500\mu\text{L}$ do meio reacional e a reação foi interrompida pela adição de 20mL de uma solução de acetona/etanol 1:1 (v/v).

Os ácidos graxos não consumidos na reação foram titulados até pH 11,0 com uma solução de NaOH 0,035N. Os brancos reacionais foram preparados retirando-se alíquotas (triplicata) de $500\mu\text{L}$ e interrompendo-se a reação com 20mL da solução de acetona/etanol 1:1 (v/v). Os brancos foram também titulados até pH 11,0 com solução de NaOH 0,035M. As dosagens de atividade foram feitas em triplicata para cada amostra liofilizada.

Uma unidade de atividade lipásica foi definida como a quantidade de enzima necessária para consumir 1µmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas, determinada por meio da Equação 1.

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

Equação 1

Onde:

AE = atividade de esterificação (U/g);

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

3.3.7 Concentração da lipase

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

O extrato enzimático contendo o sal foi transferido para tubos de centrífuga e mantido a (-10°C) durante 5 horas. Transcorrido o tempo, o mesmo foi centrifugado a 4°C por 5400xg durante 30 min, separando a fração protéica. O sobrenadante foi descartado e o precipitado removido com uma pequena quantidade de tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0 (Shu *et al.*, 2006; Menoncin *et al.*, 2009).

As amostras foram então congeladas a -80°C e liofilizadas por 48 horas. As determinações de atividade de esterificação foram realizadas conforme descrito anteriormente.

3.3.8 Caracterização parcial do extrato enzimático bruto

3.3.8.1 Especificidade do extrato enzimático com atividade de esterificação

Para a determinação da especificidade do extrato enzimático com a atividade de esterificação, utilizou-se o extrato bruto nas condições maximizadas, e previamente liofilizado. Os extratos enzimáticos, produzidos através de fermentação foram caracterizados frente a diferentes álcoois e ácidos graxos.

- Álcoois

A seletividade do extrato enzimático bruto liofilizado foi avaliada em diferentes álcoois (metanol, etanol, n-propanol e n-butanol) através da determinação da atividade de esterificação.

- Ácidos Graxos

A seletividade da enzima do extrato enzimático bruto liofilizado, foram avaliadas em ácido láurico (C12:0), oléico (C18:0) e butírico (C4:0) (Bradoo *et al.*, 2002). A atividade enzimática foi determinada de acordo com o procedimento padrão, descrito anteriormente.

3.3.8.2 Estabilidade em altas temperaturas

Para a determinação da estabilidade térmica, o extrato bruto enzimático liofilizado foi incubado em diferentes temperaturas (40, 50 e 60°C). A atividade de esterificação foi monitorada até a perda total de atividade em intervalos periódicos de 24 horas.

3.3.8.3 Estabilidade em baixas temperaturas

Foram armazenadas amostras do extrato bruto enzimático liofilizado utilizando diferentes substratos (farelo de arroz e farelo de soja) em geladeira (4°C), congelador (-10°C) e em freezer (-80°C). A atividade de esterificação foi medida

periodicamente a cada 10 dias, a fim de monitorar a estabilidade das mesmas em diferentes temperaturas de armazenamento.

3.3.9 Estudo preliminar da alcoólise de óleo vegetal utilizando lipase de *Penicillium brevicompactum* como catalisador

3.3.9.1 Substrato e solvente

O óleo de soja, o óleo de côco, e o óleo de oliva foram escolhidos como substratos a serem utilizados na alcoólise enzimática em solvente orgânico. Álcool etílico (Merck, 99% de pureza), foi utilizado nos experimentos como substrato e o solvente orgânico escolhido para a realização deste estudo foi n-hexano PA (Merck) (Faccio, 2004).

3.3.9.2 Procedimento experimental para a reação

Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 250mL, previamente fechados com tampa de vidro. As quantidades de óleo e solvente (n-hexano) foram mantidas fixas em 1g e 40mL, respectivamente. A concentração de lipase foi fixada em 40% (m/v). O excesso de solvente foi definido visando garantir completa solubilização dos substratos e produtos. Os erlenmeyers foram, então, incubados em agitador rotativo (shaker) a 200rpm por 8 horas. Após decorrido o tempo de reação, a amostra foi filtrada e levada à evaporação do solvente em estufa na temperatura de 60°C, e então diluída em 10mL de n-heptano. Seguindo este procedimento, a fase superior torna-se concentrada em ésteres etílicos (biodiesel) e a fase inferior contém os demais produtos da reação (mono e diglicerídeos, glicerol e impurezas) e também os substratos não reagidos (óleo e etanol). A conversão da reação foi determinada conforme metodologia descrita a seguir.

3.3.9.3 Determinação da conversão da reação

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

A solução foi então injetada (1mL) em triplicata em um cromatógrafo gasoso nas condições cromatográficas estabelecidas pela norma EM 14103 (2001), verificando a determinação do percentual de ésteres etílicos nas amostras e, conseqüentemente, o valor da conversão da reação. As condições cromatográficas consistem basicamente da injeção de amostras em um cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG/FID Shimadzu modelo GC 2010) equipado com injetor automático AOC-20i e uma coluna capilar RTX-Wax (30m x 0,25mm x 0,25mm), com as seguintes condições cromatográficas: temperatura inicial da coluna de 120°C, permanecendo 1 minuto nesta condição e finalmente aumentando-se a uma taxa de 15°C/minuto até 230°C permanecendo nest a condição por 2 minutos. Hélio era utilizado como gás de arraste e a temperatura do injetor e detector eram de 250°C e a taxa de split de 1:50.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESTUDO DA PRODUÇÃO DE LIPASE

4.1.1 Ensaio da produção de lipase em béqueres

Foram realizados 2 planejamentos preliminares em béqueres para avaliar a produção da enzima. No primeiro planejamento utilizou-se como substrato farelo de arroz (FA) suplementado com ureia e melão, nos valores determinados pelo planejamento de experimentos, umidade de 80% e 72 horas de fermentação. Convém salientar que a temperatura e a concentração de esporos foram fixados em 30°C e $1,5 \times 10^7$ esporos/(g farelo seco), respectivamente. No segundo planejamento adicionou-se 3% de óleo de soja na fermentação além dos outros componentes utilizados no primeiro planejamento experimental.

Os resultados obtidos no planejamento 1 em termos de atividade de esterificação do extrato enzimático bruto, para a fermentação em 72 horas, 80% de umidade são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Matriz do planejamento experimental (1) (valores reais e codificados) com as respostas da atividade de esterificação do extrato enzimático bruto.

Ensaio	Melão (%)	Ureia (%)	Atividade de esterificação (U/g)
1	-1(0)	-1(0)	89,23
2	1(4)	-1(0)	50,42
3	-1(0)	1(2)	15,86
4	1(4)	1(2)	106,02
5	0(2)	0(1)	53,66
6	0(2)	0(1)	49,82
7	0(2)	0(1)	43,71

De acordo com os valores apresentados nesta tabela pode-se observar que a máxima atividade de esterificação obtida ocorreu no ensaio 4 (106,02U/g), com o meio suplementado com 4% de melão e 2% de ureia. O ensaio 1 conduziu à segunda maior atividade de esterificação, condição experimental sem suplementação, no qual uma atividade de 89,23U/g foi obtida. No ensaio 3 ocorreu a

menor atividade enzimática no meio suplementado com 2% de ureia. A menor atividade pode estar relacionada à falta de carbono no meio de fermentação.

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 ureia ao meio sólido proporcionou aumento da atividade em torno de 6 vezes comparada à suplementação com óleo de soja como fonte de carbono.

Em seu estudo, Ferraz (2010) observou que as maiores atividades de esterificação por FES para a levedura *Sporobolomyces ruberrimus* em meio sem suplementação foram de 116,35 (em 72h); 128,88 (em 48h) e 269,39 (em 48h) U/g de substrato seco (gss) para bagaço de cana, farelo de arroz e farelo de soja, respectivamente.

Silva *et al.* (2010) observou que a máxima atividade (15,88U/g) para a FES com *P. verrucosum* utilizando como meio farelo de mamona foi obtida em 72 horas de fermentação (U=55%) sem suplementação de melação, ureia e óleo de soja. Porém, neste mesmo estudo, utilizando o fungo *Penicillium brevicompactum* em meio utilizando torta de babaçu, a maior atividade lipásica (98,78U/g) ocorreu na umidade de 65% em 96 horas de fermentação. Neste caso, o meio foi suplementado com 2% de melação, 1% de ureia e 1 % de óleo de soja.

A análise estatística dos dados permitiu a construção de um modelo matemático codificado, o qual é apresentado na Equação 2. O mesmo foi validado, com 95% de confiança, pela análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 5, onde observa-se que o coeficiente de correlação obtido foi de 0,99 e o F calculado foi de 53,15, enquanto o F tabelado foi de 19,24 (F calculado 2,76 vezes maior que o F tabelado). Com o modelo validado foi possível construir a superfície de resposta juntamente com a curva de contorno, apresentadas na Figura 3.

$$AE = 49,06 + 12,83 * ME + 16,31 ME^2 - 4,44 * U + 32,24 * ME * U$$

Equação 2

Onde:

AE: Atividade de esterificação em 72 horas de fermentação (U/g)

U: Ureia (%)

ME: Melaço (%)

Tabela 5 - Análise de variância para a atividade de esterificação no tempo de 72 horas utilizando *P. brevicompactum* e farelo de arroz como substrato.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Soma dos quadrados médios	F calculado
Regressão	5353,34	4	1338,33	53,15
Resíduo	50,37	2	25,18	
Total	5403,71	6		

$F_{\text{tab}} 19,24$ $R^2 = 0,99$

A superfície de resposta na Figura 2 (a) mostra que os valores máximos de atividade de esterificação encontram-se na região correspondente a 4% de melaço e 2% de ureia, o que pode ser melhor visualizado na curva de contorno (Figura 2 (b)). Através dessa análise fica evidente que a interação entre ureia e melaço resulta em uma maior atividade.

A temperatura e a composição dos substratos (carbono, nitrogênio, minerais e pH) também devem ser levados em consideração, pois podem ativar ou inibir a produção da enzima. Portanto, é interessante ainda ressaltar que a produção das lipases está relacionada à área total do substrato e a faixa de pH ideal está associada com a ativação do sítio catalítico das hidrolases (Fojan *et al.*, 2000).

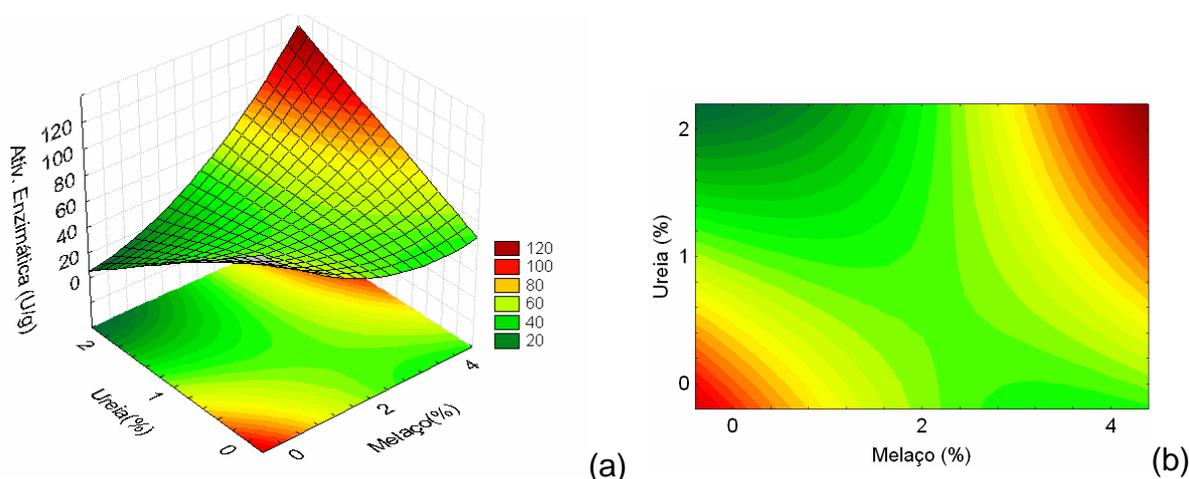


Figura 2 - Superfície de resposta para atividade de esterificação (a), curva de contorno (b), extrato bruto, planejamento 1.

Na Tabela 6 são apresentados os resultados do planejamento 2, referente ao extrato enzimático bruto obtido com a adição de 3% de óleo de soja, em 72 horas de fermentação utilizando farelo de arroz como substrato. A análise desta tabela permite verificar que a maior atividade de esterificação (127,90U/g) foi obtida no ensaio 12, na condição equivalente à adição de 2% de melação e 1% de ureia. Nota-se em todos os ensaios um aumento da atividade com o meio suplementado com 3% de óleo de soja. A menor atividade foi observada no ensaio 8 (96,50U/g), sendo ainda assim superior à obtida no planejamento 1, sem a suplementação com óleo de soja.

Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental (2) (valores reais e codificados) com a atividade de esterificação, extrato enzimático bruto com 3% de óleo de soja.

Ensaio	Melaço (%)	Ureia (%)	Atividade de esterificação (U/g)
8	-1(0)	-1(0)	96,50
9	1(4)	-1(0)	123,01
10	-1(0)	1(2)	101,87
11	1(4)	1(2)	110,06
12	0(2)	0(1)	127,90
13	0(2)	0(1)	117,50
14	0(2)	0(1)	118,00

Vários estudos comprovam a eficácia da suplementação de meios de fermentação com óleos vegetais, utilizados como fontes extras de carbono para a

produção de lipases em FES. He e Tan (2006) obtiveram máxima produção de lipase de *Candida* sp. 99-125 com o meio contendo óleo de soja (4,185%), atingindo uma atividade de 6230U/mL.

Segundo Rodriguez *et al.* (2006), que pesquisaram diferentes óleos como fonte de carbono para o crescimento do *Rhipozopus 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.

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 lipases 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 60U/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 *et al.*, 2010).

Outros trabalhos citados na literatura também investigam a utilização de diferentes indutores para a produção de lipases. Hatzinikolaou *et al.* (1996) estudaram como fonte de carbono para a produção de lipase de *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 40,5U/mL.

Com a análise estatística dos resultados de atividade de esterificação do extrato enzimático bruto, apresentados na Tabela 6, foi possível estimar os efeitos das variáveis estudadas. Observa-se no gráfico de Pareto apresentado na Figura 3.

que as variáveis, dentro das faixas estudadas, não apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) na atividade de esterificação do extrato enzimático bruto.

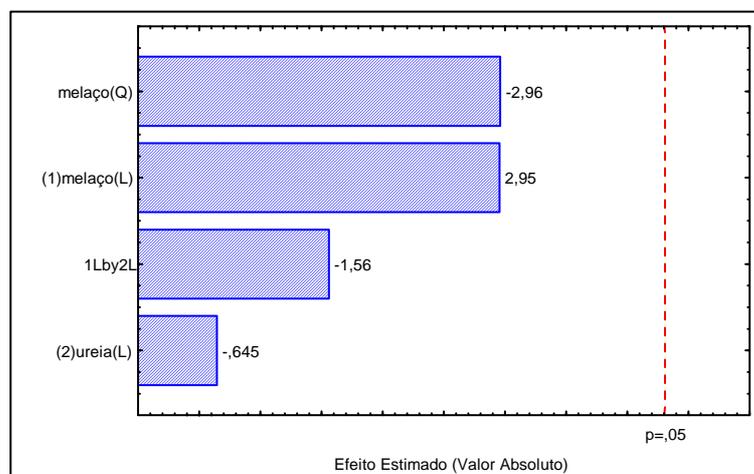


Figura 3 - Efeitos das variáveis manipuladas sobre a atividade de esterificação do extrato bruto liofilizado referente ao planejamento experimental 2.

4.1.2 Concentração do extrato enzimático com sulfato de amônio

De acordo com resultados obtidos previamente (Menoncin *et al.*, 2008), no estudo da precipitação da lipase de *Penicillium verrucosum*, a saturação de 60% com sulfato de amônio e 5 horas de precipitação foram definidos como a condição que conduziu aos melhores resultados e, desta forma, esta condição foi utilizada no presente estudo. A faixa de concentração de 60-70% de saturação foi descrita como adequada para a precipitação de enzimas produzidas com diferentes microorganismos e substratos (Sun *et al.*, 2008; Shu *et al.*, 2006; Kanwar *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2001; Prazeres *et al.*, 2006).

Na Tabela 7 são apresentados os resultados obtidos do planejamento 1, com a atividade de esterificação do extrato enzimático concentrado com 60% de sulfato de amônio, para a FES em 72 horas, 80% de umidade utilizando farelo de arroz como substrato.

Tabela 7 - Matriz do planejamento experimental (1) (valores reais e codificados) com a atividade de esterificação do extrato enzimático concentrado com sulfato de amônio 60% de saturação e extrato bruto.

Ensaio	Melaço (%)	Ureia (%)	Atividade de esterificação (U/g) Ext. Precip.	Atividade de esterificação (U/g) Ext. Bruto
1	-1(0)	-1(0)	101,31	89,23
2	1(4)	-1(0)	34,57	50,42
3	-1(0)	1(2)	18,92	15,86
4	1(4)	1(2)	17,36	106,02
5	0(2)	0(1)	43,25	53,66
6	0(2)	0(1)	59,97	49,82
7	0(2)	0(1)	48,2	43,71

De acordo com os dados apresentados na Tabela 7, observa-se que o maior valor de atividade de esterificação (101,31U/g) foi obtido no ensaio 1, após a concentração, em meio sem suplementação de ureia e melaço. No ensaio 2 e 4 a atividade diminuiu, e nos ensaios 1, 3, 6 e 7 a atividade aumentou, quando comparadas com o extrato enzimático bruto.

A análise estatística dos resultados apresentados na Tabela 7 permitiu a obtenção dos efeitos das variáveis estudadas. Os efeitos foram expressos no gráfico de Pareto, apresentado na Figura 4.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 4 pode-se observar que a interação entre as variáveis melaço e ureia possui efeito significativo negativo na atividade de esterificação do extrato enzimático concentrado, permitindo concluir que altas concentrações de nitrogênio no meio podem diminuir a atividade de esterificação da enzima.

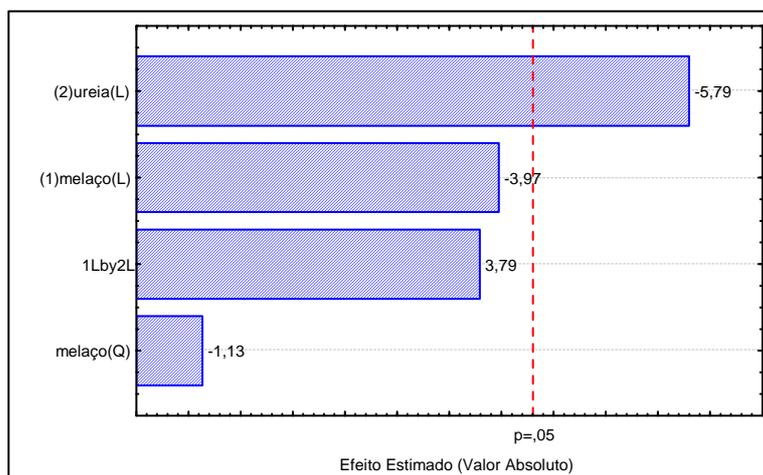


Figura 4 - Efeito das variáveis manipuladas sobre a atividade de esterificação do extrato concentrado liofilizado referente ao planejamento experimental 1.

A Tabela 8 apresenta os valores da atividade de esterificação referente ao planejamento experimental 2, extrato enzimático concentrado com sulfato de amônio 60% para a FES em 72 horas em meio suplementado com 3% de óleo de soja, utilizando farelo de arroz como substrato.

Tabela 8 - Matriz do planejamento experimental (2) (valores reais e codificados) com a atividade de esterificação do extrato enzimático concentrado com sulfato de amônio e extrato bruto.

Ensaio	Melaço (%)	Ureia (%)	Atividade de	Atividade de
			esterificação (U/g)	esterificação (U/g)
			Ext. Precip.	Ext. Bruto
8	-1(0)	-1(0)	76,42	96,5
9	1(4)	-1(0)	128,39	123,01
10	-1(0)	1(2)	87,77	101,87
11	1(4)	1(2)	97,67	110,06
12	0(2)	0(1)	113,61	127,9
13	0(2)	0(1)	131,36	117,5
14	0(2)	0(1)	150,12	118

De acordo com os valores apresentados na Tabela 8 é possível observar que a concentração do extrato enzimático conduziu a um aumento da atividade enzimática em alguns ensaios, No ensaio 14, meio suplementado com 2% de melaço e 1% de ureia, obteve-se a máxima atividade (150,12U/g), seguida da condição 13

(131,36U/g), correspondente ao meio foi suplementado com 2% de melaço, e 1% de ureia. Porém, comparando com as atividades de esterificação do extrato bruto, os ensaios 8, 10, 11 e 12 conduziram a uma diminuição da atividade de esterificação.

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).

Para o extrato concentrado do planejamento 2, nenhuma das variáveis estudadas apresentou efeito significativo com 95% de confiança.

Através dos resultados obtidos nos testes preliminares realizados em béquer, apresentados anteriormente, partiu-se para a realização dos experimentos em biorreator de leito fixo, utilizando as combinações de farelo de arroz (FA) e casca de arroz (CA), farelo de soja (FS) e casca de arroz (CA) e farelo de soja (FS) e casca de soja (CS) como substratos. Todos os meios foram suplementados com 2% de ureia, 4% de melaço e 3% de óleo de soja.

4.2 PRODUÇÃO DE LIPASES EM BIORREATOR DE LEITO FIXO

Para o estudo da produção de lipase em biorreator de leito fixo, o biorreator foi dividido em zonas de coleta do meio fermentado: topo (40cm de altura), região intermediária (20 e 30cm de altura), e fundo (10cm de altura). Tal procedimento teve por objetivo permitir uma melhor análise da atividade enzimática em todo o biorreator. A umidade foi fixada em 55%, pois teores maiores de umidade como 80% tornavam difícil o preparo do meio, conduzindo a vazamentos no biorreator devido ao excesso de umidade.

De acordo com os dados apresentados nas Tabelas 9 e 10 é possível observar que a produção de lipases em termos de atividade de esterificação aumentou conforme aumentou a altura do biorreator, nas fermentações que utilizaram FA+CA e FS+CA como substratos. Na tabela 11, a fermentação realizada com FS+CS apresentou comportamento inverso, ou seja, a produção de enzima

diminuiu conforme aumentou a altura do biorreator. Esta queda na produção pode ser conseqüência da desnaturação causada pelo aumento do calor metabólico gerado pelo micro-organismo no topo do biorreator. Esse comportamento também foi observado por Astolfi (2010), na produção de inulinase por batelada alimentada em biorreator de leite fixo.

Tabela 9 - Atividade de esterificação do extrato bruto, fermentação com FA+CA em biorreator de leite fixo.

Ensaio	Melaço (%)	Ureia (%)	Atividade de esterificação (U/g)
Topo	4	2	147,07
Meio	4	2	142,79
Fundo	4	2	34,51

Tabela 10 - Atividade de esterificação do extrato bruto, fermentação com FS+CA em biorreator de leite fixo.

Ensaio	Melaço (%)	Ureia (%)	Atividade de esterificação (U/g)
Topo	4	2	47,17
Meio	4	2	51,22
Fundo	4	2	23,54

Tabela 11 - Atividade de esterificação do extrato bruto, fermentação com FS+CS em biorreator de leite fixo.

Ensaio	Melaço (%)	Ureia (%)	Atividade de esterificação (U/g)
Topo	4	2	40,64
Meio	4	2	98,83
Fundo	4	2	66,62

4.2.1 Estudo da produção de lipase em biorreator de leito fixo utilizando farelo de arroz e casca de arroz como substratos

Nesta etapa do estudo, utilizou-se como substrato uma mistura de 1kg de farelo de arroz (FA) e 1kg casca de arroz (CA) e, com base nos resultados obtidos nos testes preliminares, fixou-se a suplementação em 3% de óleo de soja, 4% de melação, 2% de ureia, a umidade em 55% e 68 horas de fermentação.

Os resultados da atividade de esterificação do extrato enzimático bruto para a fermentação com (FA+CA), em biorreator de leito fixo foram apresentados na Tabela 9. Observa-se que a maior atividade de esterificação (147,07U/g) foi obtida no ensaio correspondente à retirada de amostra no topo do reator; a segunda maior atividade (142,79U/g) foi obtida na amostra retirada na região intermediária do fermentador (20 cm de altura).

A Figura 5 apresenta a aparência do meio fermentado dentro do biorreator. Nota-se que no topo do biorreator, onde foram coletadas estas amostras, ocorre uma concentração do fungo *Penicillium brevicompactum*, nesse local a área de oxigenação do meio é maior, favorecendo o desenvolvimento do micro-organismo.

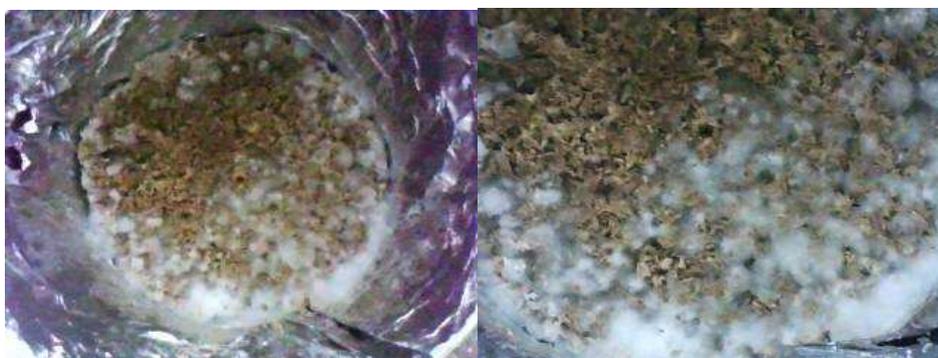


Figura 5 - Aparência do meio fermentado no biorreator de leito fixo com farelo de arroz e casca de arroz após 72 horas de fermentação. Amostra coletada no topo do fermentador.

4.2.2 Estudo da produção de lipase em biorreator de leito fixo utilizando farelo de soja e casca de arroz como substratos

Nesse estudo utilizou-se como substratos uma mistura de 2kg de farelo de soja (FS) e 2kg casca de arroz (CA), fixando a suplementação em 3% de óleo de soja, 4% de melaço e 2% de ureia e a umidade em 55%. Devido ao forte odor exalado pelo meio de fermentação, optou-se por diminuir o tempo de fermentação para 48 horas. Os resultados obtidos para a atividade de esterificação do extrato enzimático bruto foram apresentados anteriormente na Tabela 10. De acordo com esta tabela, observa-se que a maior atividade de esterificação (71,52U/g) foi obtida da amostra retirada na região intermediária do reator, seguida da amostra retirada no topo do fermentador, referente à atividade de esterificação de 47,17U/g.

Na Figura 6 (a) observa-se que o meio fermentado em biorreator de leito fixo utilizando FS+CA como substratos não apresentou visivelmente hifas do fungo, e aparenta-se compactado, dificultando a oxigenação necessária para o desenvolvimento do micro-organismo. A constatação deste fato pode ser realizada quando da comparação do meio fermentado com farelo de soja em béquer (Figura 6 (b)), onde nota-se uma grande concentração do fungo em todo o meio utilizado.



Figura 6 - Aparência do meio fermentado em biorreator de leito fixo com FS+CA (a), e a aparência do meio fermentado em béquer com FS (b).

4.2.3 Estudo da produção de lipase em biorreator de leito fixo utilizando farelo de soja e casca de soja como substratos

Nesse estudo utilizou-se como substratos uma mistura de 2 kg de farelo de soja (FS) e 2 kg casca de soja (CS), e com base nos testes anteriores, fixou-se os valores da suplementação em 3% de óleo de soja, 4% de melaço, 2% de ureia 2% e a umidade em 55% e 48 horas de fermentação. Os resultados obtidos para a atividade de esterificação do extrato enzimático bruto são apresentados na Tabela 11. A maior atividade de esterificação (112,90U/g) foi obtida a partir da amostra retirada na região intermediária do reator. A menor atividade (40,64U/g) foi obtida na amostra retirada do topo do fermentador.

Na Figura 7 (a) observa-se que o meio fermentado em biorreator de leito fixo com FS+CS, o substrato não apresentou concentração do fungo e aparenta-se compactado, dificultando a oxigenação necessária para o desenvolvimento do micro-organismo. Tal afirmação é embasada pela Figura 7 (b), que apresenta a aparência do meio fermentado com farelo de soja em béquer, onde nota-se uma concentração do fungo em toda a superfície do meio utilizado.

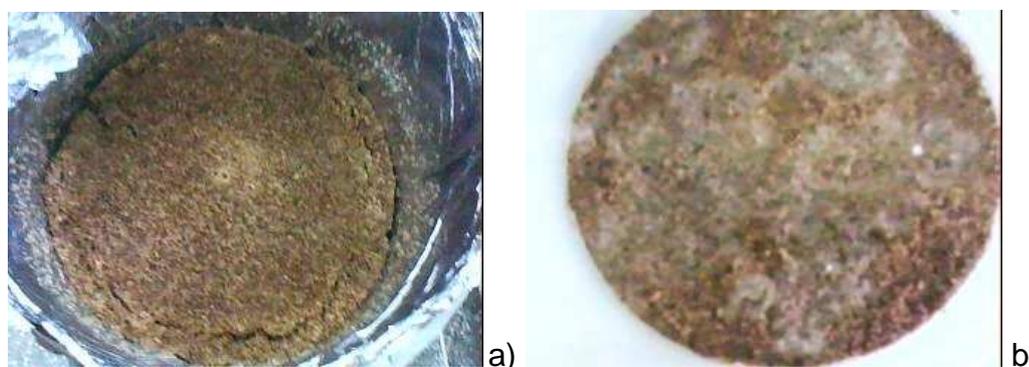


Figura 7 - Aparência do meio fermentado em biorreator de leito fixo com FS+CS (a), e a aparência do meio fermentado em béquer com FS (b).

4.2.4 Concentração por precipitação com sulfato de amônio dos extratos enzimáticos obtidos por fermentação em biorreator de leito fixo

Nesse estudo foi utilizado o extrato aquoso obtido nas fermentações em biorreator de leito fixo, com FA+CA, FS+CA e FS+CS, suplementado com 3% de óleo de soja, 4% de melaço e 2% de ureia, umidade 55%. Os respectivos extratos brutos foram concentrados utilizando sulfato de amônio a 60% de saturação. A Tabela 12 apresenta os valores de atividade de esterificação do extrato precipitado obtido da fermentação em biorreator de leito fixo utilizando FA+CA como substratos.

Tabela 12 - Atividade de esterificação do extrato precipitado, fermentação com FA+CA em biorreator de leito fixo.

Ensaio	Melaço (%)	Ureia (%)	Atividade de esterificação (U/g) Ext. Precip.	Atividade de esterificação (U/g) Ext. Bruto
Topo	4	2	77,25	147,07
Meio	4	2	26,09	142,79
Fundo	4	2	50,48	34,51

Observa-se na Tabela 12, nos ensaios referentes à retirada de amostra no topo e região intermediária do fermentador, que a adição de sal no extrato enzimático bruto conduziu à uma diminuição considerável da atividade de esterificação, comparado aos valores de atividade obtidos no extrato bruto. Porém, na amostra de fundo, a atividade de esterificação aumentou para 50,48U/g após precipitação com sulfato de amônio.

A Tabela 13 apresenta os valores de atividade de esterificação do extrato precipitado obtido da fermentação em biorreator de leito fixo utilizando FS+CA como substratos.

Tabela 13 - Atividade de esterificação do extrato precipitado, fermentação com FS+CA em biorreator de leito fixo.

Ensaio	Melaço (%)	Ureia (%)	Atividade de esterificação (U/g) Ext. Precip.	Atividade de esterificação (U/g) Ext. Bruto
Topo	4	2	18,11	47,17
Meio	4	2	27,68	51,22
Fundo	4	2	12,93	23,54

Na Tabela 13 pode-se observar novamente a diminuição da atividade de esterificação em todos os ensaios realizados para avaliação da precipitação, em comparação ao extrato bruto. A maior atividade de esterificação (27,68U/g) obtida nesta etapa refere-se à amostra retirada da região intermediária do fermentador. Atividades baixas (12,93U/g) foram observadas na amostra retirada no ensaio de fundo (20 cm de altura).

Na Tabela 14 são apresentados os valores de atividade de esterificação do extrato precipitado obtido da fermentação em biorreator de leito fixo utilizando FS+CS como substratos.

Tabela 14 - Atividade de esterificação do extrato precipitado, fermentação com FS+CS em biorreator de leito fixo.

Ensaio	Melaço (%)	Ureia (%)	Atividade de esterificação (U/g) Ext. Precip.	Atividade de esterificação (U/g) Ext. Bruto
Topo	4	2	46,21	40,64
Meio	4	2	125,4	98,83
Fundo	4	2	125,29	66,62

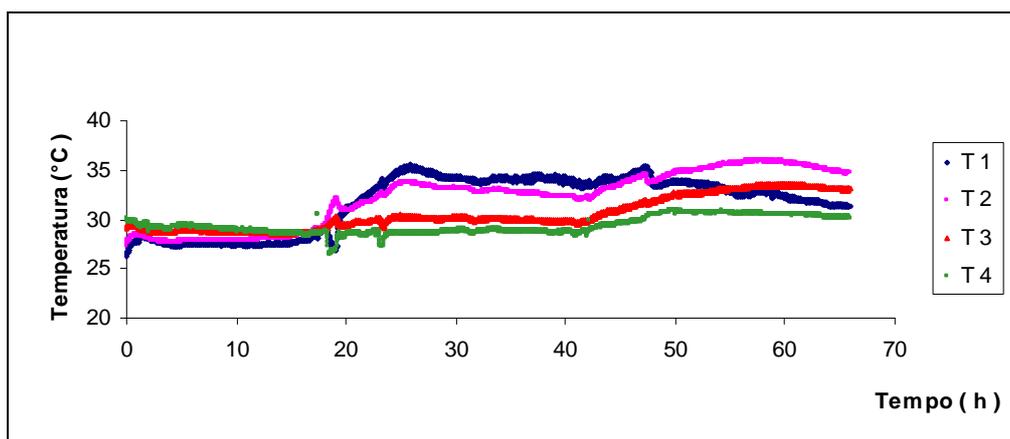
De acordo com os dados apresentados na Tabela 14, quando comparadas as atividades deste extrato precipitado com o bruto, no ensaio de meio, é possível observar que a atividade de esterificação aumenta razoavelmente de 98,83U/g para 125,40U/g após precipitação com sulfato de amônio. No ensaio de fundo, a atividade de esterificação aumentou consideravelmente de 66,62U/g no extrato bruto, atingindo valores de 125,29U/g após a precipitação.

Porém os resultados encontrados por Silva *et al.* (2010), em seu estudo de produção e caracterização parcial de lipases de *Penicillium brevicompactum* utilizando como substrato farelo de babaçu, apresentou uma atividade de esterificação de 207,40U/g em 72 horas e 120,45U/g em 96 horas, com 60% de saturação.

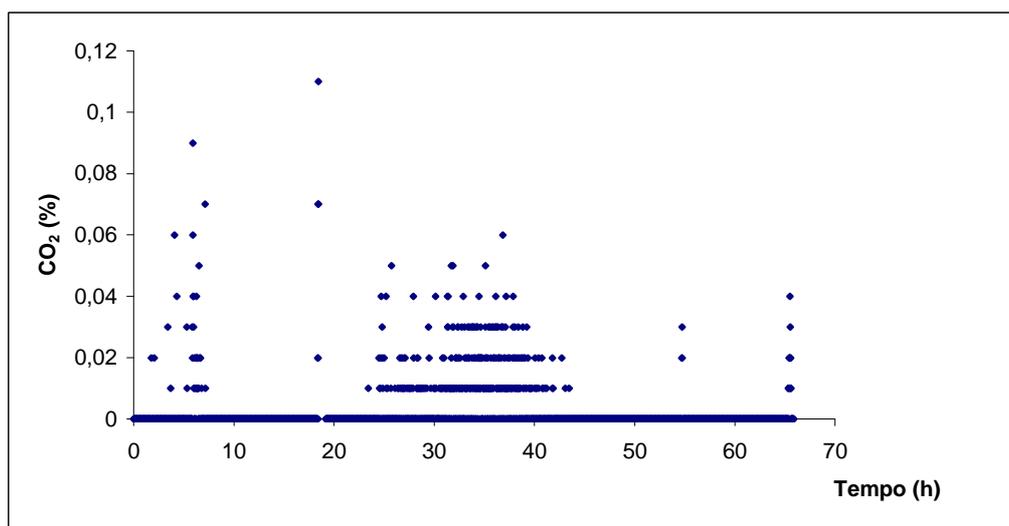
Vários trabalhos são apresentados na literatura com atividades específicas. Kanwar *et al.* (2002) encontraram uma atividade específica máxima de 19,46 U/mg precipitando lipase de *Pseudomonas* com 60% de saturação. Shu *et al.* (2006), encontraram 12,7 U/mg de atividade específica precipitando lipase de *Antrodita cinnamomea* com 70% de saturação. Menoncin *et al.* (2008) encontraram (0,91 U/mg) de atividade específica após a precipitação com 60% de saturação em 5 horas.

4.2.5 Avaliação cinética da temperatura e produção de CO₂

Na Figura 8 são apresentados os perfis de temperatura (a) e perfil de CO₂ (b), obtidos durante a fermentação em biorreator de leito fixo com o substrato FA+CA. A temperatura foi medida na entrada e saída de fluxo de ar a 10 e 40cm (T1 e T4) e no interior do biorreator a 20 e 30cm (T2 e T3), respectivamente.



(a)



(b)

Figura 8 - Perfis experimentais para temperatura (a), e perfis de CO₂ (b) obtidos nos experimentos de avaliação do processo de produção de lipase, fermentação com FA+CA.

De acordo com a Figura 8 (a) observa-se uma variação de temperatura nas 4 zonas de altura dentro do biorreator, nota-se que no fundo (T1), onde seria a entrada do biorreator, a temperatura depois de 20 horas atinge um pico, passando dos 30 para 35°C, e mantém-se razoavelmente nessa temperatura até as 50 horas de fermentação, após isso a temperatura decresce. Nesse ponto do biorreator (T1) foi encontrada a menor atividade de esterificação (34,51U/g). Em T2 e T3, correspondente à zona intermediária do reator, a temperatura também aumenta após 20 horas, porém o pico de temperatura é atingido depois de 50 horas de fermentação (T2) atingindo 35°C e (T3) em torno de 33°C. Nesta região encontrou-se a segunda maior atividade enzimática (142,79U/g). Em T4, correspondente ao topo do biorreator, a temperatura praticamente não ultrapassa os 30°C, temperatura de entrada, até o final da fermentação. Mesmo não tendo variação de temperatura em T4, foi nesta região que se obteve a máxima atividade de esterificação (147,07U/g).

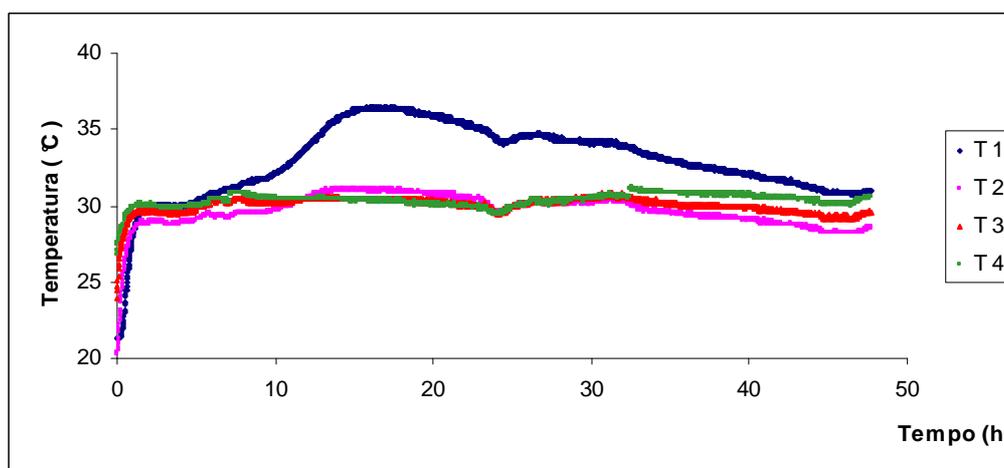
A Figura 8 (b) apresenta os perfis de concentração de CO₂ obtidos ao longo das fermentações. Através da análise da Figura 8 (b) pode-se verificar que as maiores concentrações de CO₂ foram obtidas entre 20 e 40 horas de fermentação, ou seja, no intervalo de tempo que começa a haver variação de temperatura dentro do biorreator. Esse comportamento é contrário ao estudo realizado por Mazutti *et al.* (2009) para a produção de inulinase em biorreator de leito fixo, onde foi verificado

que a produção de enzima diminuiu conforme aumentou a altura do biorreator, independente do tempo de fermentação.

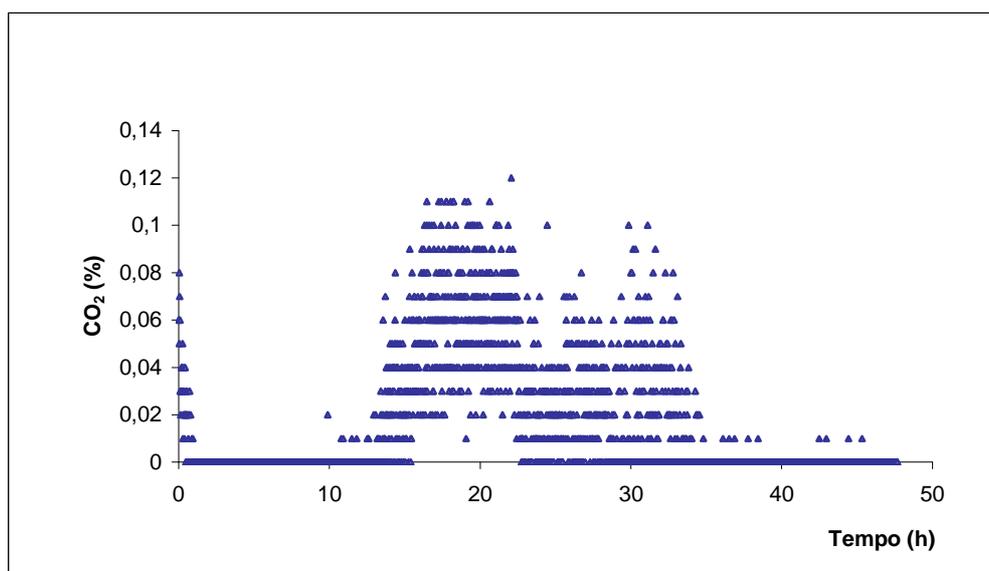
Após 48 horas de fermentação, o fundo do leito se apresentava mais quente do que a parte central e o topo. Este comportamento também tem sido descrito na literatura, podendo ser atribuído a uma combinação de efeitos. A maior parte do calor do leito é eliminada por convecção e por evaporação da água. Devido à maior intensidade de aeração no fundo do leito, há a maior geração de calor metabólico, que se acumula no fundo do reator, devido à baixa condutividade térmica do leito. Com a secagem do leito ao longo da fermentação, a transferência de calor é ainda mais prejudicada, havendo então a formação de gradientes de temperatura (Sangsurasak e Mitchell, 1998; Palma *et al.*, 2002; Durand, 2003).

O modelo matemático proposto por von Meien e Mitchell (2002) prevê que próximo à região de entrada do ar no biorreator há diferenças significativas entre a temperatura do ar e do sólido, sendo que no restante do biorreator essas temperaturas encontram-se próximas do equilíbrio, dependendo das condições de operação do biorreator.

Na Figura 9 são apresentados os perfis de temperatura (a) e perfil de CO₂ (b), obtidos durante a fermentação em biorreator de leito fixo com o substrato FS+CA. A temperatura foi medida na entrada e saída de fluxo de ar a 10 e 40cm (T1 e T4) e no interior do biorreator a 20 e 30cm (T2 e T3), respectivamente.



(a)



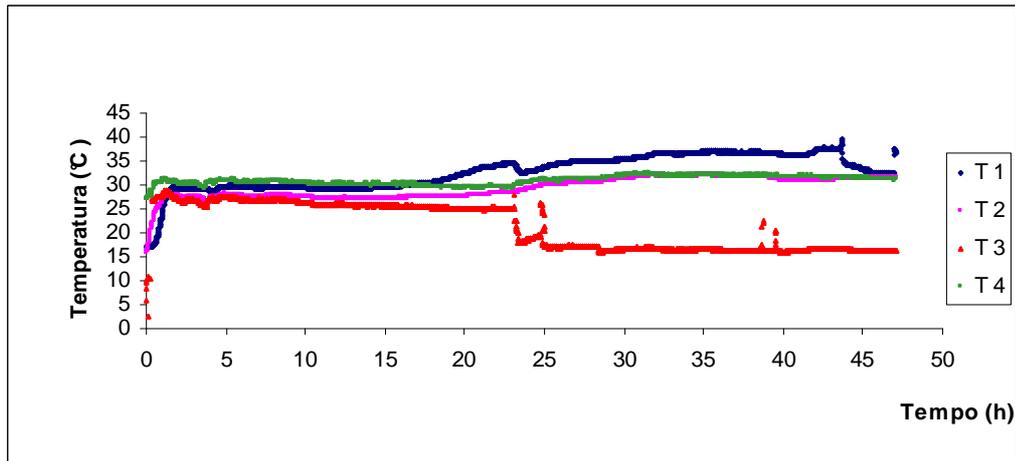
(b)

Figura 9 - Perfis experimentais para temperatura (a), e perfis de CO_2 (b) obtidos nos experimentos de avaliação do processo de produção de lipase, fermentação com FS+CA

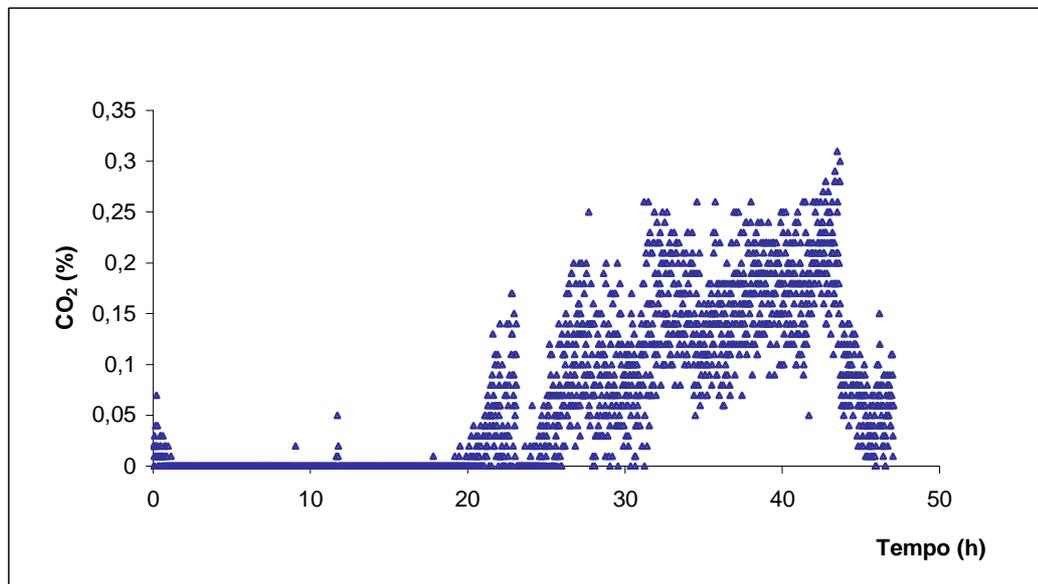
Observa-se na Figura 9 (a) que a temperatura de entrada (T1) aumenta após 10 horas de fermentação, onde atinge um pico de temperatura de 35°C , após esse período de 10 horas, a temperatura decresce para os 30°C e mantém-se até o final da fermentação. Nas alturas T2, T3 e T4, não ocorreu aumento da temperatura durante o processo, onde se manteve em 30°C . Porém, na altura T3, correspondente à região central do biorreator, foi obtido o valor máximo de atividade nesse processo ($71,52\text{U/g}$), seguida da segunda maior atividade ($47,17\text{U/g}$) em T4, correspondente ao topo do biorreator. Em T2 (10cm de altura), a atividade obtida foi de $30,92\text{U/g}$. Com relação ao perfil de CO_2 apresentado na Figura 9 (b), nota-se um aumento na concentração de CO_2 entre 10 a 40 horas de fermentação, após esse período praticamente não houve mais produção de CO_2 no processo.

O aumento da temperatura no meio é o maior desafio na operação de biorreatores de leito fixo em FES para a obtenção de bioprodutos (Fanaei e Vaziri, 2008).

Na figura 10 serão apresentados os perfis experimentais de temperatura e CO_2 obtidos da fermentação com FS+CS.



(a)



(b)

Figura 10 - Perfis experimentais para temperatura (a), e perfis de CO₂ (b) obtidos nos experimentos de avaliação do processo de produção de lipase, fermentação com FS+CS.

Na Figura 10 (a) são apresentados os perfis de temperatura em biorreator de leito fixo, obtidos da FES, utilizando FS+CS como substratos em 48 horas de fermentação. Nota-se que a temperatura de entrada (T1) do biorreator se mantém próxima dos 30°C até 10 horas de fermentação, após esse tempo a temperatura atinge um pico depois de 15 horas. Nesse ponto foi obtida uma atividade de esterificação de 66,62U/g. Nas alturas de T2 e T4 do biorreator, a temperatura de

entrada não aumentou em função do tempo, em T2 obteve-se a máxima atividade de esterificação do processo (112,90U/g). Em T4, topo do biorreator, obteve-se a menor atividade (40,64U/g), porém, na altura T3, a temperatura diminuiu gradativamente depois de 20 horas de fermentação e se manteve em torno de 15°C até o final da fermentação, nesse ponto obteve-se a segunda maior atividade (84,76U/g). Com relação ao perfil de CO₂ equivalente a esta condição (Figura 10 (b)), nota-se que a produção de CO₂ aumentou depois de 20 horas de fermentação.

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 o 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 na biorreação 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 efeito da temperatura na fermentação pode estar relacionado ao fato de que uma maior temperatura leva a uma elevada queda de umidade no meio. Como já observado por outros autores, extremos de temperatura e umidade reduzem a produção de lipases (Kamini *et al.*, 1998). Como não existem relatos na literatura para a produção de lipases em biorreator de leito fixo com *Penicillium brevicompactum* ficou difícil a comparação dos dados obtidos no processo. Contudo, pode-se ressaltar que as maiores atividades de esterificação nas três fermentações realizadas com diferentes substratos, foram obtidas nas zonas do biorreator, em que a temperatura manteve-se em 30°C, a qual seria a temperatura ótima para o crescimento do fungo *Penicillium brevicompactum*.

4.3 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO ENZIMÁTICO

4.3.1 ESTABILIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

4.3.2 Estabilidade em baixas temperaturas

As estabilidades dos extratos enzimáticos liofilizados das enzimas produzidas em biorreator de leito fixo pelo fungo *Penicillium brevicompactum* utilizando diferentes substratos (FA+CA, FS+CA e FS+CS), armazenados em geladeira (4°C), congelador (-10°C) e freezer (-80), foram monitoradas por um período de 71 dias. Neste período foram determinadas as atividades de esterificação em intervalos de tempos regulares, a cada dez dias.

A atividade lipásica (AL) relativa (%) foi associada à atividade inicial da enzima (tempo = 0 dia). A Figura 11 (a, b e c) apresenta os perfis de atividade lipásica relativa (%) ao longo do tempo de armazenamento em geladeira (4°C), congelador (-10°C) e freezer (-80°C), respectivamente.

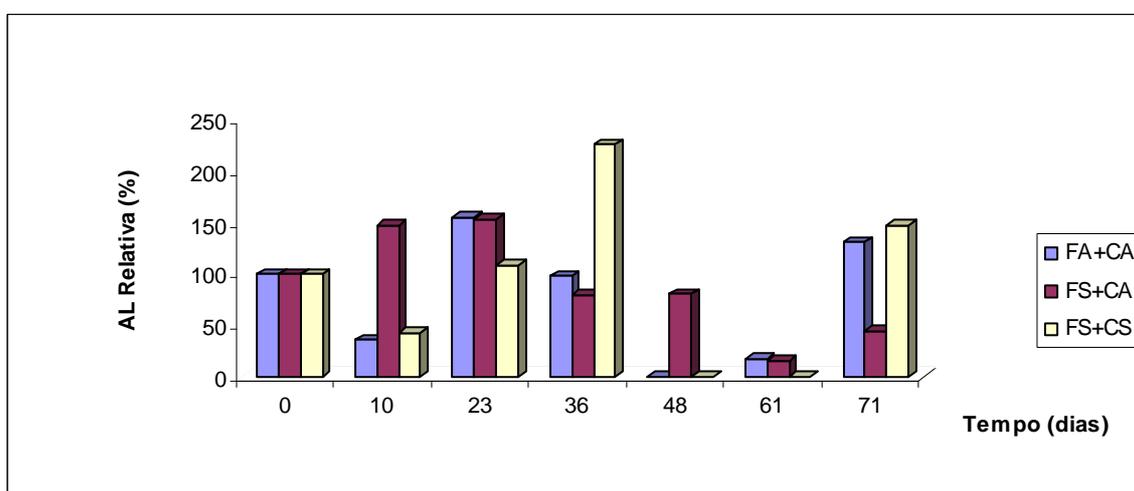
De acordo com os valores apresentados na Figura 11 (a) pode-se observar que a atividade de esterificação da enzima obtida a partir de FA+CA apresentou aumento em 54,78% em relação à sua atividade inicial após 23 dias de armazenamento, mostrando decaimento após 48 dias até 71 dias de armazenamento, atingindo atividade residual de 30,65%. Na amostra 2 (FS+CA) também houve aumento similar da atividade após 23 dias de armazenamento. Após 71 dias de armazenamento, uma diminuição de 44,5% em relação à atividade inicial foi observada. O extrato obtido a partir de FS+CS mostrou um aumento de 125,89% da atividade após 36 dias de armazenamento em geladeira. Redução similar aos outros extratos enzimáticos foi observada após 71 dias de armazenamento.

Resultado semelhante foi encontrado por Silva *et al.* (2010), que estudou a estabilidade do extrato enzimático obtido a partir de *Penicillium brevicompactum* estocado durante 86 dias em geladeira, na temperatura de 4°C. Neste período foram determinadas as atividades de esterificação a cada dez dias, observando que do 10º ao 20º dia a atividade aumentou gradativamente até atingir seu pico no 30º dia, após

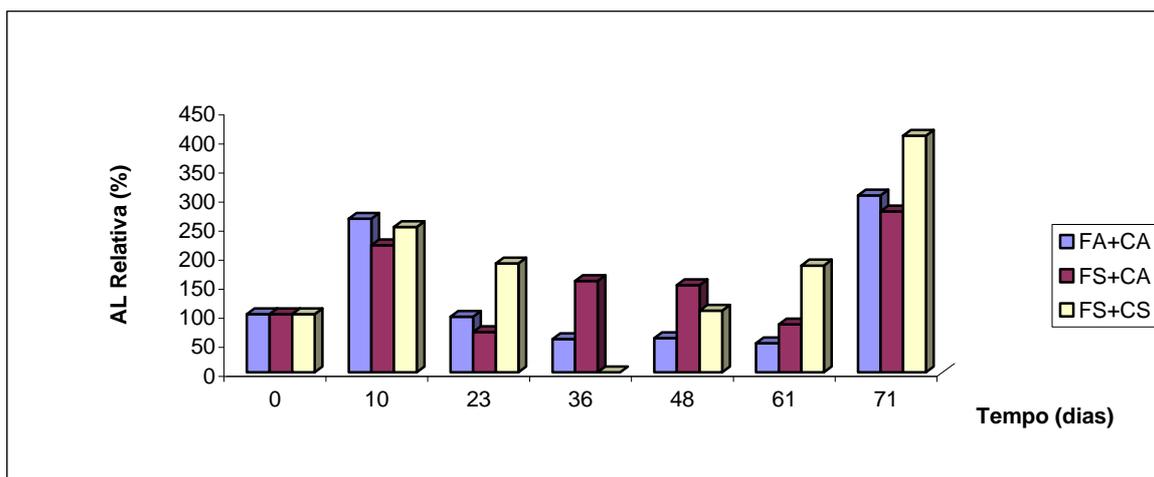
este período apresentou decréscimo e manteve sua atividade do 40º até o 86º dia. Ferraz (2010) estudou a estabilidade do extrato enzimático obtido a partir de *Sporobolomyces ruberrimus* utilizando bagaço de cana como substrato apresentou uma ativação crescente da atividade, atingindo um pico após 30 dias de incubação (68,24% em relação à atividade inicial).

Na Figura 11 (b) pode-se observar que na amostra 1 (FA+CA), a atividade inicial diminuiu gradativamente do 10º até o 61º dia de armazenamento, porém no 71º dia a atividade de esterificação relativa aumentou em 204,28%, o máximo atingido para esta amostra. Na amostra 2 (FS+CA), a atividade diminuiu no 23º dia, porém no 36º dia aumentou e manteve-se razoavelmente constante até 61 dias e no 71 dias aumentou em 76,48% a sua atividade de esterificação relativa, o máximo atingido para esta amostra. Na amostra 3 (FS+CS) pode-se observar que a atividade de esterificação diminuiu do 23º dia de armazenamento chegando a sua inativação no 36º dia, porém no 48º dia a atividade aumentou gradativamente até 71º dia onde atingiu-se o máximo de atividade de esterificação relativa 306,94%.

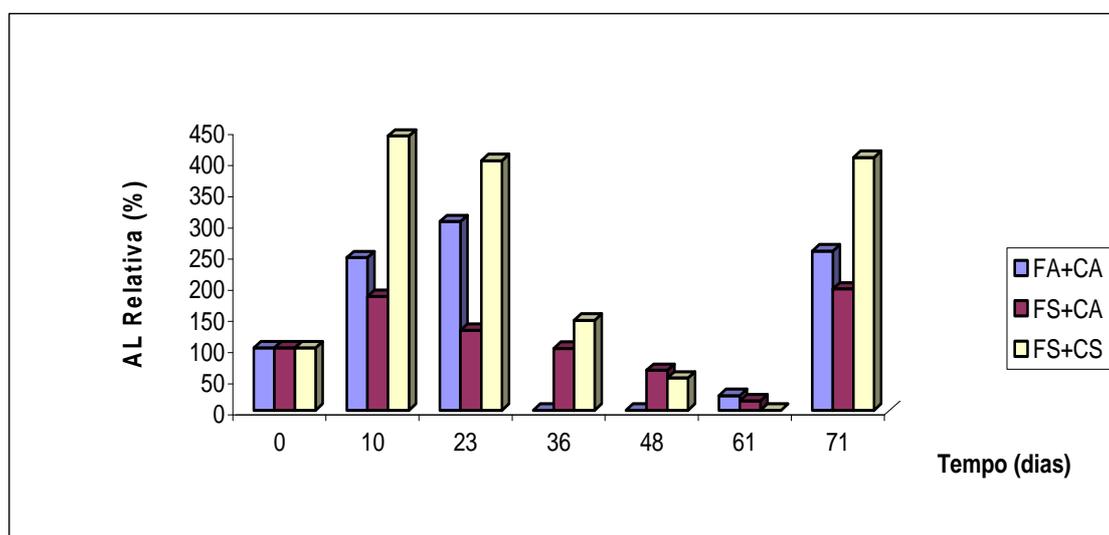
De acordo com Menoncin *et al.* (2008) esse aumento pode ser explicado pelo fato de que algumas enzimas podem se regenerar.



(a)



(b)



(c)

Figura 11 - (a) Estabilidade do extrato enzimático armazenado em geladeira (4°C), (b) estabilidade do extrato enzimático armazenado em freezer (-10°C) e (c) estabilidade do extrato enzimático armazenado em freezer (-80°C).

De acordo com os valores apresentados na Figura 11 (c) verifica-se que na amostra 1 (FA+CA) o máximo de atividade de esterificação foi obtido no 23º dia de armazenamento, onde a enzima atingiu o valor máximo de atividade relativa (aumento de 202%) para esta amostra. Do 36º até o 48º dia de armazenamento, as atividades decaíram até a sua inativação no 61º dia, no 71º dia ocorreu um acréscimo na atividade. Na amostra 2 (FS+CA), a atividade de esterificação decaiu gradativamente do 10º até o 61º dia, e ocorreu um aumento de atividade no 71º dia,

onde foi obtida o máximo de atividade de esterificação relativa, aumento de 94,82%. Na amostra 3 (FS+CS) pode-se observar que o máximo de atividade de esterificação relativa ocorreu no 10º dia de armazenamento, onde a enzima atingiu um aumento de 339,77%, no 23º dia a atividade decaiu gradativamente até a sua inibição no 61º dia, porém no 71º dia a atividade aumentou, chegando o próximo do máximo atingido (305,35%). Nota-se que as enzimas da amostra 3 possuem maior estabilidade na temperatura de -80°C mantendo uma atividade de esterificação relativa de 305,05% em 71 dias.

Como considerações finais no estudo da estabilidade enzimática em baixas temperaturas, conclui-se que o extrato enzimático bruto obtido a partir da fermentação com FA+CA, FS+CA e FS+CS, pode ser armazenada em baixas temperaturas até 71 dias sem perda da sua atividade inicial de esterificação, pois ocorre um aumento de atividade ao final do período de armazenamento, indicando a possibilidade de armazenamento por este período de tempo.

4.3.3 Estabilidade do extrato enzimático em altas temperaturas

A estabilidade térmica dos extratos enzimáticos brutos liofilizados, produzidos em biorreator de leito fixo pelo fungo *Penicillium brevicompactum* utilizando diferentes substratos (FA+CA, FS+CA e FS+CS), foi avaliada nas temperaturas de 40, 50 e 60°C, quanto à atividade de esterificação relativa, ao longo de 30 dias, em intervalos de tempos regulares a cada 24 horas.

A atividade lipásica (AL) relativa (%) foi associada à atividade inicial da enzima (tempo = 0 dia). As Figuras 12, 13 e 14 apresentam a atividade lipásica relativa (%) ao longo do tempo de incubação nas temperaturas de 40, 50 e 60°C, respectivamente.

A análise da Figura 12 permite observar que a amostra 1 atingiu seu máximo de atividade de esterificação relativa, aumento de 179,87%, no 1º dia de armazenamento, decrescendo no 2º dia e até o 27º dia e manteve-se em 31,45% com relação à atividade inicial. Na amostra 2, a enzima atingiu o seu máximo de atividade de esterificação relativa no 8º dia, aumento de 236,30%, porém no 10º dia a atividade decresceu e no 27º dia aumentou para 67,42%, voltando a decrescer até a sua

inativação. Na amostra 3, a atividade da enzima aumentou no 1º dia, e no 8º dia atingiu o máximo de atividade.

Em seu estudo, Smaniotto (2010) avaliou a estabilidade de lipases produzidas em diferentes meios (industrial e convencional), brutas e precipitadas incubadas em 45°C. Os extratos brutos, obtidos a partir de meio convencional e industrial, sofreram uma pequena ativação térmica após 20 horas de incubação (35 e 10% da atividade inicial, respectivamente). A enzima bruta produzida a partir de meio sintético sofreu desativação completa após 44 horas de incubação e a obtida em meio industrial, após 92 horas. A enzima precipitada convencional apresentou um pequeno aumento de atividade após 44 horas de incubação (10%) e manteve a atividade até 92 horas, enquanto que a enzima precipitada de meio industrial não apresentou ativação, no entanto, manteve a atividade até 116 horas.

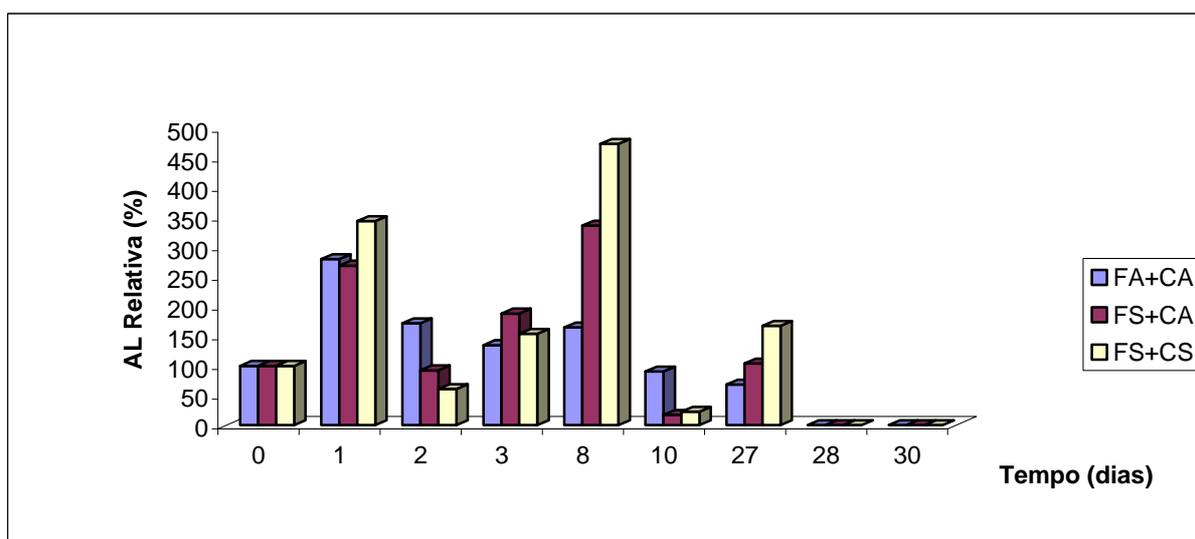


Figura 12 - Estabilidade do extrato enzimático armazenado em 40°C. Amostra 1 (FA+CA); Amostra 2 (FS+CS); Amostra 3 (FS+CS).

Porém, no estudo realizado por Ferraz (2010), as enzimas incubadas a 45°C não sofreram ativação térmica nessa condição. Contudo, a enzima obtida com bagaço de cana reteve 55,05% da sua atividade inicial após 48 horas de incubação, seguidas das enzimas obtidas por farelo de arroz e farelo de soja que mantiveram 48,17 e 45,45% de suas atividades iniciais após esse mesmo período de tempo. Ambas as enzimas sofreram desativação completa após 96 horas de incubação, sendo que a enzima produzida utilizando bagaço de cana como substrato manteve

maiores picos de atividade de esterificação em cada período de medida, quando comparada com as outras.

Na Figura 13 são apresentados os valores de atividade de esterificação para a estabilidade dos extratos enzimáticos brutos obtidos da FES em biorreator de leito fixo, armazenados à 50°C durante 30 dias.

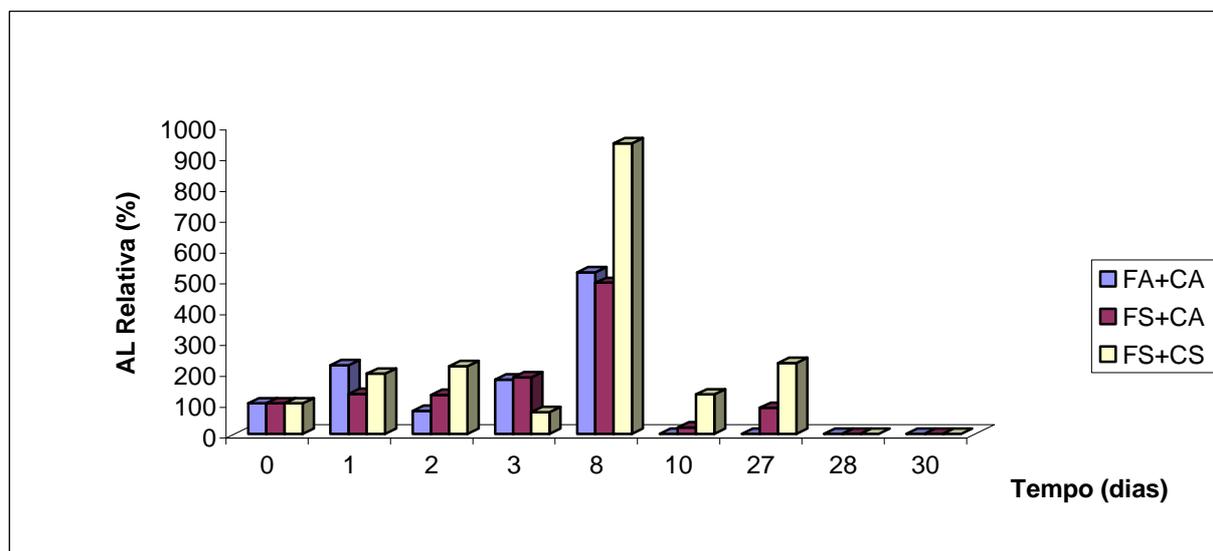


Figura 13 - Estabilidade do extrato enzimático armazenado em 50°C. Amostra 1 (FA+CA); Amostra 2 (FS+CA); Amostra 3 (FS+CS).

De acordo com os dados apresentados na Figura 13, observa-se que em todas as amostras analisadas, a atividade de esterificação relativa da enzima aumentou gradativamente até atingir seu pico de atividade no 8º dia. Nas amostras 1, 2 e 3 os aumentos foram de 425,15%, 390,89% e 843,68%, respectivamente. As amostras 2 e 3 foram completamente inativadas após 28 dias de armazenamento.

No trabalho realizado por Fernandes *et al.* (2004), em temperaturas mais elevadas (37, 50 e 60°C) a enzima perdeu a sua atividade rapidamente, mantendo menos de 40% da atividade inicial após 30 minutos de incubação.

Na Figura 14 são apresentados os valores de atividade de esterificação para a estabilidade dos extratos enzimáticos brutos obtidos da FES em biorreator de leito fixo, armazenados à 60°C durante 30 dias.

De acordo com os dados apresentados na Figura 14 observa-se que a amostra 1 (FA+CA) atingiu o máximo de atividade de esterificação relativa, aumento de 62,64% no 1º dia, após a atividade diminuiu e no 27º dia manteve-se em 45,44% da sua atividade inicial. No 28º dia de armazenamento, o extrato apresentou atividade nula. Na amostra 2 (FS+CA) notou-se que no 2º dia de armazenamento foi obtido um pico de atividade de esterificação relativa de 148,31%, porém no 3º dia diminuiu, até inativação no 28º dia de armazenamento. Na amostra 3 (FS+CS), observou-se uma maior resistência da enzima à temperatura de 60°C quando comparada a atividade das outras amostras. No 1º dia a atividade de esterificação relativa atingiu um pico de 79,86% e no 27º dia manteve 80,07% da sua atividade inicial. Após este período, o extrato enzimático foi inativado.

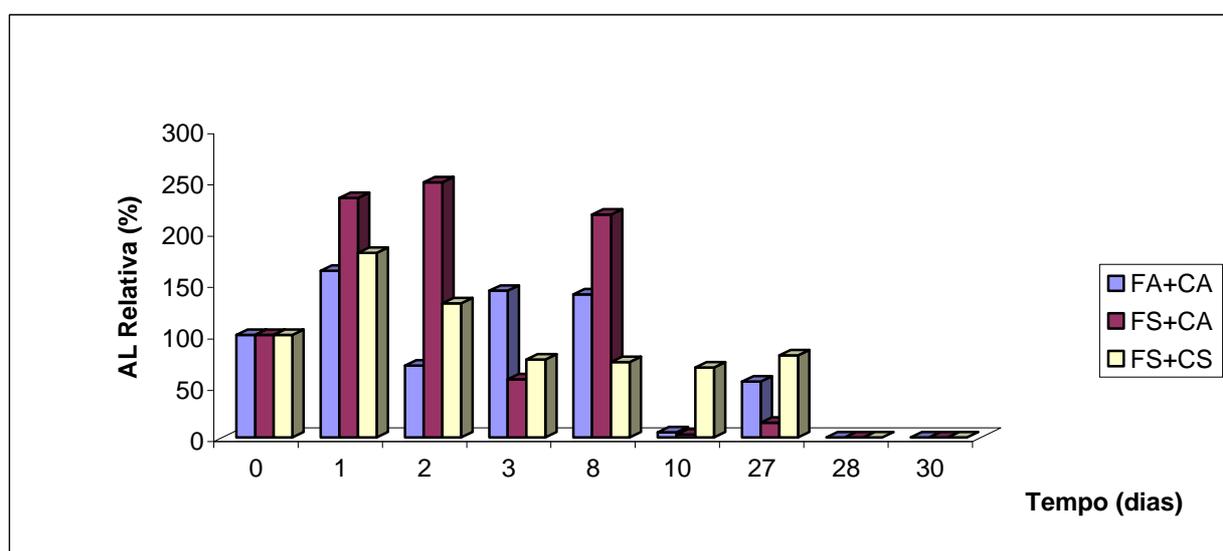


Figura 14 - Estabilidade do extrato enzimático armazenado em 60°C. Amostra 1 (FA+CA); Amostra 2 (FS+CA); Amostra 3 (FS+CS).

No estudo da estabilidade a 60°C realizado por Smaniotto (2010), resultados semelhantes foram observados. Todas as enzimas apresentaram uma alta desativação térmica, sendo que a enzima bruta, obtida em meio convencional, mostrou-se a mais sensível à temperatura elevada, apresentando uma desativação total após 44 horas de incubação. As demais enzimas (bruta industrial e precipitada, industrial e convencional) mantiveram a atividade até 92 horas de incubação.

Cao *et al.* (2009) estudaram a estabilidade de uma lipase produzida por *Burkholderia cepacia* encapsulada em sílica a 60°C. Foi observado um aumento de cerca de 40% na atividade após 1 hora de incubação, porém após 12 horas a atividade foi reduzida à cerca de 50% do valor inicial. No trabalho realizado por Fernandes *et al.* (2004), em temperaturas mais elevadas (37, 50 e 60°C), a enzima perdeu a sua atividade rapidamente, mantendo menos de 40% da atividade inicial após 30 minutos de incubação.

Como conclusão parcial, pode-se concluir que as enzimas produzidas a partir de FS+CS, possuem maior estabilidade em temperaturas de 40,50 e 60°C, podendo ser armazenadas nessas temperaturas por até 27 dias.

4.3.4 Especificidade do extrato enzimático bruto frente a diferentes substratos

Neste trabalho realizou-se a avaliação do efeito de diferentes álcoois e ácidos graxos na atividade de esterificação da lipase produzida através da FES, em biorreator de leito fixo, extrato enzimático bruto.

Os valores apresentados na Figura 15 mostram a influência de diferentes álcoois (etanol, butanol, metanol, propanol) na atividade de esterificação com diferentes ácidos graxos. Pode-se observar maior afinidade das enzimas obtidas quando os substratos usados foram são ácidos graxos de cadeia longa (C18:1) e média (C12:0) em presença de álcoois de cadeia longa, no caso de ácido oléico e propanol, e ácido láurico com butanol e propanol.

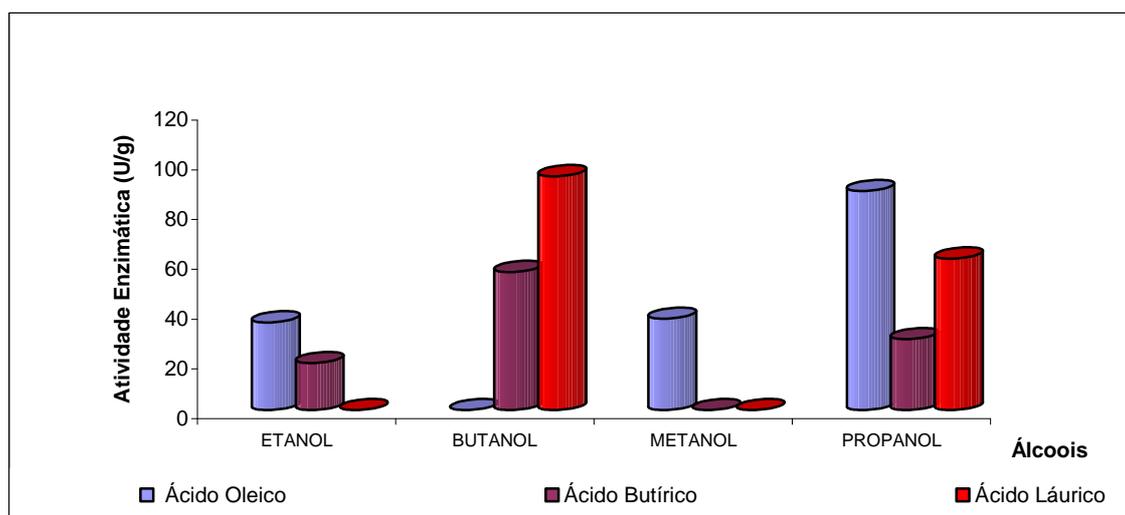


Figura 15 - Especificidade do extrato enzimático da reação com diferentes álcoois e diferentes ácidos graxos. Amostra 1 (FA+CA).

Observa-se na Figura 15 (amostra 1) que o emprego do ácido láurico e butanol como substratos resultou na maior atividade de esterificação, atingindo um pico de 94,03U/g na enzima produzida com FA+CA como substrato. Esta mesma enzima atingiu a segunda maior atividade (87,98U/g) quando ácido oléico foi empregado como doador acila e com propanol como álcool. Nota-se a preferência da enzima por ácidos graxos de cadeias longas e álcoois de cadeias médias e curta.

Na Figura 16 nota-se que a enzima obtida a partir de FS+CA apresentou maior afinidade quando o ácido graxo utilizado como substrato foi de cadeia longa (C18:1), tanto na presença de álcoois de cadeia curta quanto de cadeia longa. O emprego de ácido oléico como doador acila resultou na maior atividade de esterificação atingindo 94,05U/g na enzima produzida utilizando farelo de soja e casca de arroz como substrato, reagindo com propanol como álcool. Essa mesma enzima obteve a segunda maior atividade (85,75U/g) reagindo com metanol como álcool.

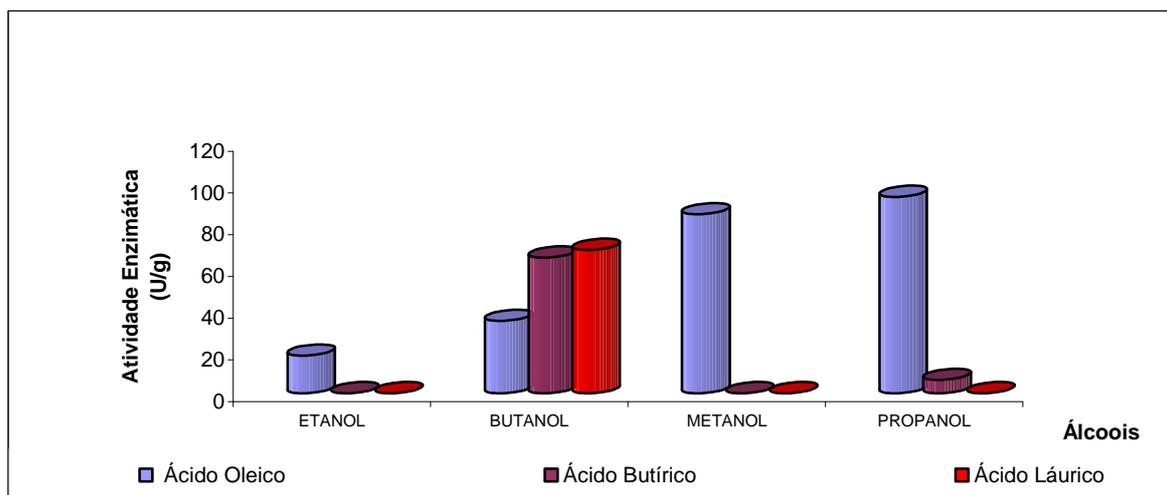


Figura 16 - Especificidade do extrato enzimático da reação com diferentes álcoois e diferentes ácidos graxos. Amostra 2 (FS+CA).

É possível observar na Figura 17, referente ao emprego do extrato enzimático obtido a partir de FS+CS, que o uso de ácido oléico como doador acila conduziu às maiores atividades de esterificação, com um pico de atividade de 90,24U/g, quando metanol foi utilizado como álcool. Essa mesma enzima atingiu a segunda maior atividade de esterificação (62,72U/g) reagindo com propanol.

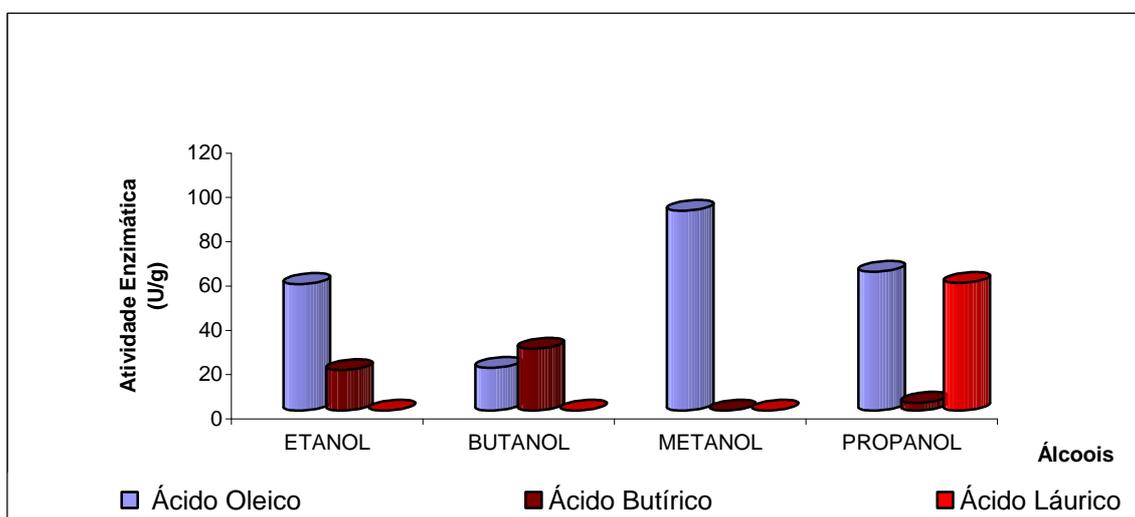


Figura 17 - Especificidade do extrato enzimático da reação com diferentes álcoois e diferentes ácidos graxos. Amostra 3 (FS+CS).

Os dados apresentados mostram que, de uma forma geral, as enzimas apresentaram maior especificidade em relação ao ácido graxo de cadeia longa

(ácido oléico), aos álcoois de cadeia carbônica curta (metanol e etanol) e intermediária (propanol), porém quando butanol foi utilizado, a atividade de esterificação diminuiu.

Trabalhos encontrados na literatura, avaliando a especificidade de lipases em relação a ácidos graxos com diferentes cadeias carbônicas, em geral, relatam maior especificidade dessas enzimas em relação a ácidos graxos de cadeia média a longa (C8 a C16) (Sun e Xu, 2009; Wang *et al.*, 2008). 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 álcoois investigados foram etanol, n-propanol, i-butanol e i-pentanol. Os autores verificaram que os maiores rendimentos foram obtidos com álcoois de maior cadeia. Os álcoois de maiores cadeias estudados foram n-butanol e n-propanol, tendo os mesmos apresentado as maiores conversões.

Cabe ressaltar que a amostra mostrou ter boa afinidade com ácidos graxos de cadeia longa em presença de metanol, propanol e etanol, contudo quando houve a troca de álcool por butanol na reação, os valores de atividade decresceram.

4.4 APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO NA ALCOÓLISE DE ÓLEO VEGETAL

Ésteres são importantes compostos orgânicos com um número crescente de aplicações comerciais. Estes compostos são amplamente utilizados para a preparação de compostos aromáticos (*flavors*), cosméticos, detergentes, sabores e produtos farmacêuticos. Muitos dos ésteres disponíveis são produzidos por sínteses químicas ou enzimáticas. A produção biotecnológica de ésteres utilizando lipases tem recebido grande atenção por causa das condições de reações brandas (temperatura, pH e pressão) envolvidas, o elevado grau de pureza alcançado, bem como a aceitação destes produtos na indústria de alimentos (Martínez-Ruiz *et al.*, 2008).

Na Tabela 15 são apresentados os valores obtidos em termos de conversão na alcoólise enzimática de diferentes triglicerídeos para as amostras dos extratos enzimáticos obtidos da mistura de FA+CA, 55% de umidade, 3% de óleo de soja, 2%

de ureia, 4% de melaço, 68 horas; mistura de FS+CA, 55% de umidade, 3% de óleo de soja, 2% de ureia, 4% de melaço, 48 horas; mistura de FS+CS, 55% de umidade, 3% de óleo de soja, 2% de ureia, 4% de melaço, 48 horas.

Tabela 15 - Conversões obtidas na alcoólise enzimática de diferentes óleos em solvente orgânico. Extrato enzimático bruto.

Extrato enzimático*	Triglicerídeos	Ésteres (%)
FA+CA	Óleo de Soja	1,20
FS+CA	Óleo de Soja	0,05
FS+CS	Óleo de Soja	0,16
FS+CA	Óleo de Oliva	2,88
FS+CS	Óleo de Oliva	2,48
FA+CA	Óleo de Oliva	2,68
FS+CS	Óleo de Côco	0,45
FA+CA	Óleo de Côco	0,55
FS+CA	Óleo de Côco	1,02

*Extrato enzimático obtido da mistura de substratos na fermentação

A partir dos resultados apresentados na Tabela 15 pode-se observar que as maiores conversões foram obtidas na amostra de extrato obtido utilizando FS+CA como substrato (2,88%) e na amostra de extrato de FA+CA obteve-se 2,68% de conversão, ambas utilizando óleo de oliva como substrato para a alcoólise. Cabe ressaltar que extratos enzimáticos brutos em condições não otimizadas foram testadas. Resultado semelhante encontrado por Silva (2010), mostrando que quando utilizado extrato enzimático bruto obtido a partir de torta de babaçu, 70% de umidade, 2% de óleo de soja, 72 horas, obteve-se uma conversão de 1,21 % e no extrato bruto de farelo de mamona, 70% de umidade e 2 % de óleo de soja, 96 horas obteve-se 0,93% de conversão. Porém, quando o extrato de torta de babaçu (80% de umidade, 72h) e de farelo de mamona (70% de umidade, 96h) foram precipitados, conversões de 15,05 e 6,47% foram obtidas, respectivamente.

No trabalho realizado por Rampim (2007), o metanol foi mais conveniente para a conversão de lipases de *P. fluorescens*, que apresentou 90% de conversão

quando utilizado óleo de girassol, enquanto a lipase de *R. miehei* foi capaz de conduzir a conversões de 80%. No estudo de Luo *et al.* (2006), que investigaram a enantioseletividade de uma lipase psicrófila de *P. fluorescens*, para produção de biodiesel, conversão de 24,8% foi obtida.

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. Esse fato também foi observado nos estudos feito por He *et al.* (2007); Silva *et al.* (2007); para transesterificação contínua e não-catalítica de óleos vegetais sem adição de cossolvente. De acordo com os resultados obtidos neste estudo pode-se dizer que as enzimas produzidas do extrato bruto das fermentações não possuem potencial para a aplicação na síntese de ésteres de biodiesel, pois apresentou baixos valores de conversão.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 CONCLUSÕES

Após a realização deste estudo pode-se concluir que:

- ✓ Para os ensaios preliminares da produção de lipase em farelo de soja: Avaliação da produção da lipase e da suplementação do meio com resíduos agroindustriais (ureia, melaço), 72 horas de fermentação e 80% de umidade, com a atividade de esterificação para o extrato enzimático bruto, planejamento 1:
 - A máxima atividade de esterificação obtida foi de 106,02U/g nas condições maximizadas com o meio suplementado com 4% de melaço (carbono) e 2% de ureia (nitrogênio).

- ✓ Para os ensaios preliminares da produção de lipase: Avaliação da produção da lipase e da suplementação do meio com resíduos agroindustriais (ureia, melaço e óleo de soja), 72 horas de fermentação e 80% de umidade, com a atividade de esterificação para o extrato enzimático bruto; planejamento 2:
 - A máxima atividade de esterificação 127,90U/g foi obtida nas condições de 2% de melaço, 1% de ureia e 3% de óleo de soja.

- ✓ Para a concentração do extrato enzimático com 60% de sulfato de amônio, planejamento 1:
 - A máxima atividade foi de 101,31U/g após a concentração com sulfato de amônio, em meio sem suplementação de ureia e melaço.

- ✓ Para a concentração do extrato enzimático com 60% de sulfato de amônio, planejamento 2:
 - A máxima atividade foi de 150,12U/g após a concentração com sulfato de amônio, meio suplementado com 2% de melaço e 1% de ureia, 3% de óleo de soja

- ✓ Para a produção de lipase em biorreator de leito fixo, fermentação com FA+CA, atividade de esterificação:

- A maior atividade de esterificação 147,07U/g foi obtida no Topo (40cm de altura) do biorreator, nas condições de 55% de umidade, 68 horas de fermentação, meio suplementado com 4% de melaço, 2% ureia, 3% de óleo de soja.
- ✓ Para a produção de lipase em biorreator de leito fixo, fermentação com FS+CA, atividade de esterificação:
 - A maior atividade de esterificação 51,22U/g foi obtida no Meio (20cm de altura) do biorreator, nas condições de 55% de umidade, 48 horas de fermentação, meio suplementado com 4% de melaço, 2% ureia, 3% de óleo de soja.
- ✓ Para a produção de lipase em biorreator de leito fixo, fermentação com FS+CS, atividade de esterificação:
 - A maior atividade de esterificação 98,83U/g foi obtida no Meio (20cm de altura) do biorreator, nas condições de 55% de umidade, 48 horas de fermentação, meio suplementado com 4% de melaço, 2% ureia, 3% de óleo de soja.
- ✓ Para a concentração do extrato enzimático obtido em biorreator com 60% de sulfato de amônio:
 - Fermentação com FA+CA em biorreator de leito fixo:
 - A máxima atividade de esterificação 77,25U/g foi obtida no Topo (40cm de altura) do biorreator.
 - Fermentação com FS+CA em biorreator de leito fixo:
 - A máxima atividade de esterificação 27,68U/g foi obtida no Meio (30cm de altura) do biorreator.
 - Fermentação com FS+CS em biorreator de leito fixo:
 - A máxima atividade de esterificação 125,40U/g foi obtida no Meio (20cm de altura) do biorreator.
- ✓ Para a caracterização bioquímica da lipase com atividade de esterificação obtida no biorreator de leito fixo:

Estabilidade a baixas temperaturas

Extrato enzimático bruto obtido da fermentação com FA+CA

- Com o extrato enzimático mantido a 4°C a maior atividade relativa obtida foi de 154,78% em 23 dias.
- Com o extrato enzimático mantido a -10°C, a maior atividade relativa foi de 304,28% em 71 dias.
- Com o extrato enzimático mantido a -80°C, a maior atividade relativa foi de 439,77% em 10 dias.

Extrato enzimático bruto obtido da fermentação com FS+CA

- Com o extrato enzimático mantido a 4°C a maior atividade relativa obtida foi de 152,37% em 23 dias.
- Com o extrato enzimático mantido a -10°C, a maior atividade relativa foi de 276,48% em 71 dias.
- Com o extrato enzimático mantido a -80°C, a maior atividade relativa foi de 194,82% em 71 dias.

Extrato enzimático bruto obtido da fermentação com FS+CS

- Com o extrato enzimático mantido a 4°C a maior atividade relativa obtida foi de 225,89% em 36 dias.
- Com o extrato enzimático mantido a -10°C, a maior atividade relativa foi de 406,94% em 71 dias.
- Com o extrato enzimático mantido a -80°C, a maior atividade relativa foi de 439,77% em 10 dias.

Estabilidade em altas temperaturas

Extrato enzimático bruto obtido da fermentação com FA+CA

- Com o extrato enzimático mantido a 40°C a maior atividade relativa obtida foi de 279,87% no primeiro dia.
- Com o extrato enzimático mantido a 50°C, a maior atividade relativa foi de 525,15% em 8 dias.
- Com o extrato enzimático mantido a 60°C, a maior atividade relativa foi de 162,64% no primeiro dia.

Extrato enzimático bruto obtido da fermentação com FS+CA

- Com o extrato enzimático mantido a 40°C a maior atividade relativa obtida foi de 336,30% em 8 dias.
- Com o extrato enzimático mantido a 50°C, a maior atividade relativa foi de 490,89% em 8 dias.
- Com o extrato enzimático mantido a 60°C, a maior atividade relativa foi de 248,31% em 2 dias.

Extrato enzimático bruto obtido da fermentação com FS+CS

- Com o extrato enzimático mantido a 40°C a maior atividade relativa obtida foi de 343,39% no primeiro dia.
- Com o extrato enzimático mantido a 50°C, a maior atividade relativa foi de 943,68% em 8 dias.
- Com o extrato enzimático mantido a 60°C, a maior atividade relativa foi de 179,86% no primeiro dia.

Especificidade

Extrato enzimático bruto obtido da fermentação com FA+CA

- ◆ Para a atividade de esterificação possui maior especificidade por álcoois de cadeia longa, e ácidos graxos de cadeia longas e médias.

Extrato enzimático bruto obtido da fermentação com FS+CA

- ◆ Para a atividade de esterificação possui maior especificidade por álcoois de cadeia curta e longas, e ácido graxo de cadeia longa.

Extrato enzimático bruto obtido da fermentação com FS+CS

- ◆ Para a atividade de esterificação possui maior especificidade por álcoois de cadeia curta e longa, e ácidos graxos de cadeia longa.

Utilização do extrato bruto como catalisador da reação de alcoólise de óleo vegetal

- ◆ A melhor conversão obtida foi na amostra de FS+CA (2,88%), em óleo de oliva.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos para a produção de lipases obtida por FES em biorreator de leito fixo sugere-se:

- ◆ Avaliar o estudo de concentração do extrato enzimático obtido da FES em farelo de arroz e farelo de soja com o fungo *Penicillium brevicompactum* a fim de se obter condições de maximização nas atividades de esterificação;
- ◆ Avaliar a estabilidade dos extratos enzimáticos em diferentes memórias de pH;
- ◆ Estudo de otimização da produção de lipase, incluindo a avaliação de outros resíduos agroindustriais em biorreator de leito fixo;
- ◆ Testar novos parâmetros para reação de alcoólise a fim de aumentar as conversões utilizando o extrato enzimático bruto e/ou concentrado;
- ◆ Realização de estudos de imobilização dos extratos testando diferentes suportes;
- ◆ Testar a avaliação da atividade dos extratos enzimáticos obtidos após tratamento em fluidos pressurizados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H. E COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p.589-595, 2003.

ADACHI, S.; KOBAYASHI, T. Synthesis of ester by immobilized-lipase-catalyzed condensation reaction of sugars and fatty acids in water-miscible organic solvents. Review. *Journal of Biosciences and Bioengineering*, v.;99, p. 87-94. 2005.

ALKAN, H., BAYSAL, Z., UYAR, F., DOGRU, M. Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 136, p.183-192, 2006.

ALONSO, F.O.M. Efeito da agitação e aeração na produção de lípases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682). Rio de Janeiro: 2001. Dissertação de mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

ALVAREZ-MACARIE, E.; BARATTI, J. Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*,v 10 p. 377-383, 2000.

ASHLEY, V. M.; MITCHELL, D. A.; HOWES, T., Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, v. 3, p. 141-150, 1999.

ASTOLFI V.; Produção de inulinase por fermentação em estado sólido usando estratégias de fermentação batelada e batelada alimentada em biorreator de leito fixo. 2010. *Dissertação de mestrado* em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional do Alto Uruguai das Missões Campus de Erechim, RS, Brasil.

BACHA, A.B.; GARGOURI,Y.; ALI,Y.B.;MILED,N.; REIBOLT, J.; MEJDOUB, H. Purification and biochemical characterization of ostrich pancreatic lipase. *Enzyme and microbial technology*, v.37, p. 309-317, 2005.

BENJAMIN, S., PANDEY, A., Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Braz. Arch. of Biol. and Technol.*, v. 44, p. 213-221, 2001.

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. *Appl." Biochem. Biotechnol"*, v.136-140, p. 105-114, 2007.

BIANCHI, V.L.D., MORAES, I.O., CAPALBO, D.M.F. Fermentação em estado sólido, *Biotechnologia Industrial – Engenharia Bioquímica*, 1ª edição, Ed. Edgard Blücher Ltda, v. 2, p. 247-276, 2001.

BORNSCHEUER, U.T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Review.*, v. 733, p. 1-9, 2002.

BORZANI W., LIMA U. A., AQUARONE E., SCHMIDELL W.; *Processos Fermentativos e Enzimáticos – Biotechnologia Industrial*, 1ª edição. Editora Edgard Blücher,v. 3, p. 377-378, 2001.

BRAOO S., RATHI P., SAXENA R.K GUPTA R.; Microwave-assisted rapid characterization of lipase selectivities. *Journal of Biochemistry*, v. 51, p.115-120. 2002.

BUCALÁ, V.; FORESTI, M.L.; TRUBIANO, G.; FERREIRA, M.L.; BRIOZZO, M.; BOTTINI, S. Analysis of solvent-free ethyl oleate enzymatic synthesis at equilibrium conditions. *Enzyme and Microbial Technology.*, v. 38, p. 914-920. 2006.

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., RORIGUES M.I.; Optimization of extracelular lipase production by *Geotrichum sp.* using factorial design. *Bioresource Techonology.*, v. 91, p. 77-84, 2004.

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

CARVALHO, P. O., CAMPOS, P. R. B., NOFFS, M. A., OLIVEIRA, J. G., SHIMUZU, M. T., SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova.* v. 26, p. 75-80. 2003.

CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; SANT`ANNA, G.L.; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochem. Eng. J.*, v. 4, p. 239-247, 2000.

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

CAO, X., YANG, J., SHU, L., YU, B. E YAN, Y. Improving esterification activity of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in sílica by bioimprinting with substrate analogues. *Process Biochemistry.*,v. 44, p. 177-182. 2009.

CHRISTEN, P, ANGELES, N. FARRES, A. E REVAH, S. *Lipase production by Rhizopus delemar grown on a synthetic support in solid state fermentation.* in: Roussos, E.S., Lonsane, B.K., Raimbault, M., Viniegra-Gonzalez, G. (eds.) Proceedings of the 2nd International Symposium on Solid State Fermentation (FMS95 Montpellier, França), *Kluwer Academic Publishers*, 1997, Londres

CHOWDARY, G.V.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Enzymatic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: a multivariate analysis. *Process Biochemistry*, v. 36, p. 331-339. 2001.

COLEN G., JUNQUEIRA R.G., MORAES-SANTOS T.; Isolation and screening alkaline lipase-production fungi from Brasil soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 22, p. 881-885, 2006.

CORDOVA, J.; NEMMAOUI, M.; ISMAÏLI- ALAOUI, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive

oil cake and sugar cane bagasse. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic.*, v. 5, p. 75-78, 1998.

COUTO, S. R., SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. *Journal of Food Engineering.*, v. 76, p. 291–302, 2006.

COWIESON, A. J.; HRUBY, M.; PIERSON, E. E. M. Evolving enzyme technology: impact on commercial poultry nutrition. *Nutrition Research Reviews*, v. 19, p. 90-103. 2006.

DAMASO, M. C. T.,¹; PASSIANOTO, M. A., FREITAS, S. C., FREIRE, D. M. G., LAGO, R. C. A. L., COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.39, p. 676-681, 2008.

DI LUCCIO, M.; CAPRA, F.; RIBEIRO, N.P. Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. *App. Biochem. Biotechnol.*, v. 113, p. 173-180, 2004.

DOMÍNGUEZ, A., COSTAS, M., LONGO, M.A., SANROMÁN, A. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*. , v. 25, p. 1225-1229, 2003.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 113-125 , 2003.

DÖRMO N., BÉLAFI-BAKÓ K., BARTHA L., EHRENSTEIN U., GUBICZA L.; Manufacture of and environmental safe biolubrificant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system. *Biochemical Engineering Journal*, v.21, n.3, p. 229-234, 2004.

ELIBOL, M., OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochem.*, v. 36, p. 325-329, 2000.

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. Biotechnol.*, v. 60, p. 97-103, 1998.

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.

FANAEI, M. A.; VAZIRI, B. M., Modeling of temperature gradients in packed-bed solid-state bioreactors. *Chemical Engineering and Processing*, DOI: 10.1016/j.cep.2008.06.001, 2008.

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

FERRAZ R.L.; Produção e caracterização parcial de lipases de *Sporobolomyces ruberrimus* utilizando como substratos resíduos agroindustriais. Erechim: 2010. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada.

FERRER, M., PLOU, F.J., NUERO, O.M., REYES, F., BALLESTEROS, A. Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. *J. of Chem. Technol. and Biotechnol.*, v. 75, p. 569-576, 2000.

FOJAN, P., JONSON, P.H., PETERSEN, M.T.N., PETERSEN, S.B.; What distinguishes an esterase from a lipase: *A novel structural approach. Biochimie.*, v. 82, p. 1033-1041, 2000.

FORESTI M.L.; FERREIRA, M.L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterification. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2006.

FREIRE, D.M.G. *Seleção de microrganismos 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., TELES, E.M.F., BON, E.P.S., SANT'ANNA Jr., G.L. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, v. 63-65, p. 409-421, 1997b.

GANDHI N.N.; Application of lipase. *Journal of the American Oil Chemists Societ*, v. 74, p. 621-634, 1997.

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.

GERVAIS, P., MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 85-101, 2003.

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 Biochem.*, v. 35, p. 85-90, 2000

GUPTA, M. N. Enzyme function in organic solvents. *European Journal of Biochemistry.*, v. 203, p. 25-32. 1992

GUTPA, R., GUPTA, N., RATHI P.; Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.64, p. 763-781. 2004.

GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOGLU, U. The production of isoamyl Acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. *Process Biochemistry.*, v. 38, p. 379-386. 2002.

HAMIDI-ESFAHANI, Z.; HEJAZI, P.; SHOJAOSADATI, S. A.; HOOGSCHAGEN, M.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; RINZEMA, A., A two-phase kinetic model for fungal growth in solid-state cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 36, p. 100-107, 2007

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microbiol. Technol.*, v. 39, n. 1-2, p. 235-251, 2006.

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. *Chemical Engineering Journal.*, v. 85, p. 61-68, 2002.

HE, H., TAO W., ZHU, S.; Continuons production of biodiesel from vegetable oil using supercritical methanol process. *Fuel*, v. 86, p. 442-447, 2007.

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

JAEGER, K.E.; DIJSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annual Rev. Microbiol.*, v. 53, p. 315-351, 1999.

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

KANWAR S.S., GHAZI I.A CHIMN S.S., JOSHI G.K., RAO G.V., KAUSHAL R.K., GUPTA R., PUNJ V.; Production of a *Pseudomonas* in n-alkane substrate and isolation using and improved ammonium sulfate precipitation technique. *Bioresource Techonology*, v.84, p. 207-211, 2002.

KRISHNA, S.H.; KARANTH, N.G. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate. A Kinetic study. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1547, p. 262-267, 2001.

KUSDIANA D., SAKA S.; Kinetics of transesterification in rapeseed oil to Biodiesel fuel as treated in supercritical methanol. *Fuel*, :v.80, p. 693-698. 2001.

LANGONE M.A.,DE ABREU M.E., REZENDE M.J., SANT'ANNA JR. G.L., Enzymatic synthesis of medium chain monoglycerides in a solvent-free system. *Appl. "Biochem. Biotechnol"*., v.100 p. 987-996, 2002.

LEKANDA, J. S.; PÉREZ-CORREA, J. R., Energy and water balances using kinetic modeling in a pilot-scale SSF bioreactor. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1793-1802, 2004.

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

LONSANE, B. K., GHIDYAL, N.P., BUDIATMAN, S., RAMAKRISHNA, S.V. Engineering aspects of solid state fermentation. *Enz. and Microbial Technol.*, v. 7, p. 258-265, 1985.

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.*, v. 73, p. 349-355, 2006.

MAIA, M.M.D., MORAIS, M.M.C., MORAIS Jr., M.A., MELO, E.H.M., LIMA FILHO, J.L. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. *Rev. de Microbiol.*, v.30, p. 01-10, 1999.

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.*, v. 38, p. 715-721, 2002.

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.

MAREK A., BEDNARSIK W.; Some factores affecting lipase production by yeasts and filamentous fungi. *Biotechnology Letters.*, v. 18, p. 1155-1160, 1996.

MARÍA. P.D.; XENAKIS, A.; STAMATIS, H.; SINISTERRA, J.V. Lipase factor (LF) as a characterization parameter to explain the catalytic activity of crude lipases from *Candida rugosa*, free or immobilized in microemulsion-based organogels. *Enzyme and Microbial Technology.*, v. 35, p. 277-283, 2002.

MARTÍNEZ-RUIZ, A., GARCÍA, H. S., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., FAVELATORRES, E. Organic Phase Synthesis of Ethyl Oleate Using Lipases Produced by Solid-state Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology.*, v. 151, p 393-401, 2008.

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 do Rio de Janeiro.

MARTINS, V.G. Co-produção de lipase e biosurfactante em FES para utilização em biorremediação de oleos vegetais e hidrocarbonetos. *Quimica Nova.*, v. 31, p. 1942-1947, 2008.

MAZUTTI, M. A.; SKOVRONSKI, A.; BONI, G.; ZABOT, G.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M. DI.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; TREICHEL, H. Partial characterization of inulinases obtained by Submerged and solid-state Fermentation using agroindustrial residues as substrates: a comparative study. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009.

MENDES, A.A., CASTRO, H.F. Biotratamento para redução do teor de lipídeos presentes em efluentes das indústrias de produtos lácteos. CD-Rom. Simpósio Internacional de Fermentações - SINAFERM, Florianópolis, SC, 2003.

MENONCIN, S., DOMÍNGUES, 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, *Food and Bioprocess Technology: An International Journal*. 2008:DOI 10.1007/s11947-008-0104-8.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A., New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to design, operation and scale-up of bioreactors. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1211-1225, 2000.

MITCHELL, D. A.; von MEIEN, O. F.; KRIEGER, N., Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 137-147, 2003.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M., Solid-state fermentation bioreactors. Springer-Verlag, Berlin, 2006.

MONTESINOS J.L., OBRADORS N., GORDILLO M.A., VALERO F. S.; Effect of nitrogen sources in batch and continuous culture to lipase production by *Candida rugosa*. *Appl. Biochemistry Biotechnology*, v.59, p. 25-37. 1996.

NINI, L.; SARDA, L.; LOUIS-CLAUDE,C.; BOITARD, E.; JEAN-PAUL, D.; CHAHINIAN, H. Lipasecatalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a Kinetic study. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1534, p. 34-44, 2001.

PASTORE, G. M., COSTA, V. S., KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial da lipase extracelular produzida por nova cepa de *Rhizopus sp*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.*, v. 23, p 135-140, 2003.

PALMA, M.B.; PINTO, A.L.; GOMBERT, A.K.; SEITZ, K.H.; KIVATINITZ, S.C.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 84-86, p.1137-1145, 2000.

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

PANDEY, A., SOCCOL, C.R. *Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications*. Londres, Asiatec Publishers, 2001, 221p.

PATEL, R. N. Microbial / enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme and Microbial Technology.*, v. 31, p. 804-826, 2002.

PEREIRA, E.B., TEIXEIRA, R.M., CASTRO, H.F., FURIGO Jr., A. Tratamento enzimático utilizando lipases em rejeitos industriais frigoríficos. CD-Rom, XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ, Natal, RN, 2002.

PERSSON M., MLADENOSKA I., WEHTJE E., PATRICK ADLERCREUTZ P.; Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technolog.*, v. 31, p. 833–841, 2002.

PETER, F. E PREDA, G. Characterization of pancreatic lipase substrate specificity in organic reaction media by kinetic method. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, v.1920, p. 467-472, 2002.

PINTADO, J., TORRADO, A., GONZÁLEZ, M.P., MURADO, M.A. Optimization of nutrient concentration for citric acid production by solid-state culture of *Aspergillus niger* on polyurethane foams. *Enzyme and Microbial Technology.*, v. 23, p. 149-156. 1998.

PIZARRO, A. V. L., PARK, E. Y. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochemistry.*, v. 38, p. 1077-1082, 2003.

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.*, v. 37, p. 505-5-9, 2006.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G., Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 127-135, 2003.

RAMACHANDRAN S., SINGH S.K., LARROCHE C., SOCOOL C.R., PANDEY A.; Oil cakes and their biotechnological applications - A review. *Bioresource Technology*, 2007:98:2000-2009.

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.

RAO, P.V, JAYARAMAN, K., LAKSHMANAN, C. M. Production of Lipase by *Candida rugosa* in Solid State Fermentation. 1: Determination of Significant Process Variables. *Process Biochem.*, v. 28, p. 385-389, 1993.

RIGONI, R. E.; RIGO, E.; FREIRE, D.M.G.; OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M. Utilização de lipases como auxiliar na degradação de gordura do flotado de indústria de carnes. CD-ROM - XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES - SINAFERM, 2003, Florianópolis. Anais do Congresso, Florianópolis UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

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

ROBINSON, T.; NIGAM, P. Bioreactor design for a protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 197-203, 2003.

RODRIGUES, D. S., CAVALCANTE, G. P., SILVA, G. F., FERREIRA, A. L. O., GONÇALVES, L. R. B. Effect of additives on the esterification activity of immobilized *Candida antarctica* lipase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.*, v. 24, p. 833–839, 2008.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos, Campinas SP, Editora Casa do pão, 2005.

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

ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; PREBOIS, J. P.; LONSANE, B. K., Zymotis, a large scale solid state fermenter. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 42, p. 37-52, 1993.

SALIS, A.; PINA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *J. Biotechnol.*, v. 119, p. 291-299, 2005.

SANGSURASAK, P.; MITCHELL, D. A., Incorporation of death kinetics into a 2-D dynamic heat transfer model for solid-state fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 64, p. 253-260, 1998.

SATO, K., SUDO, S. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology - Small-scale solid-state fermentations*. 2^a edition, Washington, p. 61-79, 1999.

SAXENA R.K., SHEORAN A., GIRI B., DAVIDSON W.S. Purification strategies for microbial lipases. *Journal Microbiology Methodology*, v.52, p. 1-18. 2003.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, Purification, Characterization and Applications of lipases. *Research review paper. Biotechnol. Adv.*, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHU, C.; XU, C.; LIN, G. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry.*, v. 41, p. 734 – 738, 2006.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. S.; SILVA, R. da; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. *Process Biochemistry.*, v. 40, p.2885-2889, 2005.

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.*,v.46, p. 5304-5309. 2007.

SILVA, M.F.; FREIRE, D.M.G.; CASTRO, A.M.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M.A.; OLIVEIRA, J.V.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2010: 34:145-152 DOI 10.1007/s00449-010-0455-1

SINGHANIA, R., PATEL, A. K., SOCCOL, C. R., PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal.*, v. 44, p 13–18, 2009.

SMANIOTTO, A. Produção e caracterização parcial de uma 'lipase sintética' produzida por uma nova cepa de *Sporobolomyces ruberrimus*. 2010. *Dissertação de mestrado* em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional do Alto Uruguai das Missões Campus de Erechim, RS, Brasil.

SOCCOL, C.R., MARIN, B., RAIMBAULT, M., LEBEAULT, L.M. Potential of solid state fermentation for production of L(+) lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 41, p. 286-290, 1994.

SUN, S. Y., XU, Y. Membrane-bound 'synthetic lipase' specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative investigation. *Bioresource Technology.*, v. 100, p.1336–1342, 2009.

TREICHEL H, OLIVEIRA D, MAZUTTI M A, DI LUCCIO M, OLIVEIRA J V. A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology.*, v. 3, p. 182-196. 2010.

TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I., Use of a sequential strategy of experimental design to optimize the inulinase production in a batch bioreactor. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 36, p. 895-900, 2009a.

UL-HAQ, I.; IDRESS VARGAS, V.A.; DELGADO, O.D.; HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. Lipase producing microorganisms from a Kenyan alkaline soda lake. *Biotechnology Letters.*, v. 26, p. 1565-1568, 2004.

VARGAS, V.A.; DELGADO, O.D.; HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. Lipase producing microorganisms from a Kenyan alkaline soda lake. *Biotechnology Letters.*, v. 26, p. 1565-1568, 2004.

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. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.*, v. 83, p. 47–54. 2008.

VIRTATEN, V.; NYSSOLA, A.; LEISOLA, M.; SEISKARI, P., An aseptically operatable static solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal, In press*, 2008.

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

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. *Biotechnology and Bioengineering.*, v. 79, p. 416-428, 2002.

XU X.B.; Biodiesel using bioprocessing technologies: The time is coming, *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, v. 110, p. 863-864, 2008.

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. *Biochemical Engineering Journal*, v. 41, p. 30-37, 2008.

WILKINSON, B.; BACHMANN, B.O. Biocatalysis in pharmaceutical preparation and alteration. *Current Op. Chemical Biology*, v. 10, 1969-1976, 2006.