

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

**PRODUÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS VISANDO CATÁLISE DE REAÇÕES DE  
SINTESE**

**JULIANA RIZZARDI**

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

**ERECHIM, RS**  
**JULHO 2012**

# **PRODUÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS VISANDO CATÁLISE DE REAÇÕES DE SÍNTESE**

Juliana Rizzardi

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

Comissão Julgadora:

---

Débora de Oliveira, D. Sc.  
(Orientadora)

---

Helen Treichel, D. Sc.  
(Orientadora)

---

Luciane Maria Colla, D. Sc.  
(Orientadora)

---

Telma Elita Bertolin, D. Sc.  
UPF

---

Elisandra Rigo, D. Sc.  
URI – Campus de Erechim

Erechim, Julho de 2012

**“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer  
um novo começo, qualquer um pode começar  
agora e fazer um novo fim”**

**Chico Xavier**

Dedico esta conquista a todos que acreditaram em mim, que me incentivaram e apoiaram nos momentos mais difíceis desta caminhada.

## **Agradecimentos**

**As minhas orientadoras Luciane Maria Colla, Helen Treichel e Débora de Oliveira**

Pelo exemplo, orientação, oportunidade, confiança, compreensão e incentivo, minha eterna amizade e dedicação.

**A professora Telma Elita Bertolin**

Pela amizade, atenção e carinho.

**As bolsistas Luísa Bortoluzzi, Tatiana Smaniotto e Kelly Pelc**

Pela contribuição no desenvolvimento da parte experimental deste trabalho, pela agradável convivência e amizade construída.

**A minha amiga Marceli Silva**

Pela contribuição nas atividades deste trabalho, pelo otimismo, competência, apoio, incentivo, incansável dedicação e pela sua agradável companhia, minha eterna gratidão e admiração.

**A minha amiga Aline Moreira**

Pela colaboração na realização deste trabalho, pela parceria, companheirismo, conversas, amizade, atenção, conselhos nos momentos das minhas crises existenciais e profissionais e por estar sempre disposta a me ajudar.

**Ao meu pai Ademir Rizzardi**

Pelo exemplo de homem e pai, pela oportunidade, amor, incentivo, apoio e zelo em todos os momentos da minha vida. Mesmo longe, sempre será meu porto seguro. Obrigada pai por tudo que você fez e faz por mim. Desta conquista você é parte fundamental. Amo você.

**Ao meu namorado Vinícius Mocinho**

Pelo amor, carinho, companheirismo, amizade, dedicação, paciência e incentivo. Obrigada por estar sempre perto de mim. Amo você.

**A minha tia Débora Finger, minha irmã Melissa Rizzardi e aos primos Nathália Rizzardi, Diego Saldanha e Renan Nickhorn**

Pelo carinho, força, apoio e incentivo. Tia, obrigada por sempre ter acreditado em mim.

**A minha amiga Faira Damiani**

Pela amizade incondicional em todos os momentos da minha vida, atenção, apoio, incentivo, conselhos, por estar sempre disposta a me ouvir proporcionando segurança e conforto. Obrigada pela sua verdadeira amizade. Amo você.

**Aos meus amigos Alexandre Petry, Roberto Huf, Quênia Fornasari e Cássia Borges de Camargo**

Pela amizade, incentivo e apoio durante essa trajetória.

A todos que, direta ou indiretamente, perto ou distante, contribuíram e ou fizeram parte deste especial e particular trajeto da minha vida, sou imensamente grata. Muito obrigada.

Resumo da dissertação apresentado ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos

## **PRODUÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS VISANDO CATÁLISE DE REAÇÕES DE SÍNTESE**

Juliana Rizzardi  
Julho/2012

Orientadores: Débora de Oliveira  
Helen Treichel  
Luciane Maria Colla

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. Dessa forma, as lipases constituem, atualmente, um importante grupo de enzimas com enorme potencial para aplicações biotecnológicas por serem enzimas versáteis que podem ser produzidas utilizando uma ampla variedade de substratos. Os objetivos deste trabalho foram: selecionar fungos produtores de lipases com atividade de esterificação via fermentação em estado sólido; avaliar a influência das variáveis como a umidade, a concentração de uréia e óleo de soja (fontes de nitrogênio e indutor) e a proporção de farelo e casca de soja no meio de cultivo, sobre a produção de lipases; avaliar a especificidade das lipases em relação aos ácidos graxos (oleico, butírico e láurico) para a reação de esterificação a partir de duas formas de produção da enzima (meio de cultivo sem e com ajuste de pH para 4,5) e duas formas de obtenção da enzima (extração em meio líquido seguido de liofilização e liofilização direta do farelo fermentado) e avaliar a aplicação das lipases na reação de alcoólise de óleo vegetal. Quatro fungos filamentosos foram selecionados como produtores de lipases com atividade de esterificação em 96 horas de fermentação, o fungo O<sub>4</sub> (*Aspergillus niger*) (364,58 U/g), o fungo O<sub>5</sub> (*Aspergillus* sp.) (465,01 U/g), o fungo E<sub>13</sub> (*Trichoderma* sp.) (61,49 U/g) e o fungo *Aspergillus fumigatus* (182,92 U/g). Na etapa de estudo de variáveis somente os fungos O<sub>4</sub> (*Aspergillus niger*) e *Aspergillus fumigatus* apresentaram atividades de esterificação, sendo que as maiores atividades foram obtidas com 65 % de umidade, 1 % de uréia, 1 % de óleo de soja e 80 % de farelo de soja. A lipase produzida pelo fungo O<sub>4</sub> (*Aspergillus niger*) apresentou especificidade pelo ácido oleico (C18:1) e pelo ácido butírico (C4:0); a maior atividade de esterificação na reação com ácido oleico e com ácido butírico foi de 451, 50 U/g e 661, 43 U/g, respectivamente, estas atividades são referentes à amostra em que o pH do meio não foi ajustado e feita a liofilização direta do farelo fermentado. A lipase produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* apresentou especificidade pelo ácido oleico, com máxima atividade de 395,43 U/g na amostra em que o pH do meio era de 4,5 e feita a liofilização direta do farelo fermentado. Utilizando o ácido butírico como substrato na reação de esterificação, somente a lipase produzida em meio sem ajuste de pH e feita a liofilização direta do farelo fermentado apresentou atividade de esterificação (410, 75 U/g). Na reação de alcoólise de óleo vegetal, a lipase produzida pelo fungo O<sub>4</sub> (*Aspergillus niger*) apresentou maior conversão (5,32 %) na amostra em que o pH

do meio era 4,5 e feito a extração em meio líquido seguido da liofilização da enzima. Já a lipase produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* apresentou maior conversão (2,55 %) na amostra em que o pH do meio era 4,5 e feito a liofilização direta do farelo fermentado.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Food Engineering

## **FUNGAL LIPASE PRODUCTION FOR CATALYSIS OF SYNTHESIS REACTION**

Juliana Rizzardi  
Julho/2012

Orientadores: Débora de Oliveira  
Helen Treichel  
Luciane Maria Colla

Lipases (EC 3.1.1.3) are hydrolases and are associated to the metabolism and hydrolysis of lipids, widely present in the nature. These enzymes acting on the aqueous-organic interface catalyzing the hydrolysis of ester-carboxyl bonds and releasing acids and organic acids. However, the inverse reaction, esterification, can occur in a restricted water environment. Thus, lipases are currently an important group of enzymes with great potential for biotechnological applications because they are versatile enzymes that can be produced using a wide variety of substrates. The aims of this study were: to select fungi to lipases with activity of esterification production through solid state fermentation; to evaluate the influence of humidity, concentration of urea and soybean oil (source of nitrogen and inductor) and the proportion of bran and soybean hulls in culture medium on production of lipases; to evaluate the specificity of lipases to fatty acids (oleic, lauric and butyric) in the esterification reaction from two ways of producing the enzyme (culture medium with and without adjustment of pH to 4.5) and two forms of obtaining the enzyme (in liquid extraction followed by freeze drying and lyophilization direct fermented bran); and evaluate the application of lipases in the alcoholysis reaction of vegetable oil. Four filamentous fungi have been selected as producing lipases with activity esterification in 96 hours of fermentation: strain O<sub>4</sub> (*Aspergillus niger*) (364.58 U/g), strain O<sub>5</sub> (*Aspergillus* sp.) (465.01 U/g), strain E<sub>13</sub> (*Trichoderma* sp.) (61.49 U/g) and *Aspergillus fumigatus* (182.92 U/g). In the stage of study of variables that have influence in the lipase production, only the strain O<sub>4</sub> (*Aspergillus niger*) and *Aspergillus fumigatus* showed activity of esterification, with the highest activities obtained with 65% moisture, 1% urea, 1% soybean oil and 80% soy meal. The lipase produced by the fungus O<sub>4</sub> (*Aspergillus niger*) showed specificity for oleic acid (C18: 1) and butyric acid (C4: 0), the highest activity in the esterification reaction with oleic acid and butyric acid being 451,50 U/661 g, 43 U/g, respectively. These activities are related to the sample where the medium pH was not adjusted and made lyophilization direct from the fermented bran. Using butyric acid as substrate in the esterification reaction, only the lipase produced in the medium without pH adjustment and lyophilization direct from fermented bran showed activity esterification (410,75 U/g). In the reaction of alcoholysis of vegetable oil, the lipase produced by the fungus O<sub>4</sub> (*Aspergillus niger*) showed a higher conversion (5.32%) in the sample in which the pH of the medium was 4.5 and extraction done in liquid medium followed by enzyme lyophilization. However the lipase produced by the fungus *Aspergillus fumigatus* showed a higher conversion (2.55%) in the sample in which the pH of the medium was 4.5 and lyophilization direct from fermented bran.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 LIPASES.....	19
2.1.1 Fontes de lipases.....	20
2.1.2 Produção de lipases.....	21
Microrganismos utilizados na produção de lipases por FES.....	25
Composição do meio de cultivo na produção de lipases por FES.....	26
Umidade do meio de cultivo na produção de lipases por FES.....	30
Temperatura e pH de produção de lipases por FES.....	31
2.1.3 Caracterização das lipases.....	33
Especificidade.....	33
Estabilidade.....	36
2.1.4 Aplicações das lipases.....	38
Reações de esterificação e transesterificação.....	40
2.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1 MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS.....	46
3.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	46
3.2.1 Teor de umidade do substrato.....	47
3.2.2 Seleção de microrganismos produtores de lipase com atividade de esterificação ..	47
Preparo do inóculo.....	49
Preparo do meio de cultivo e aparato experimental.....	49
Extração e liofilização das lipases.....	50
Determinação das atividades de esterificação.....	50
3.2.3 Estudo de variáveis na produção de lipases pelos fungos previamente selecionados.....	51
3.2.4 Avaliação da especificidade das lipases frente a diferentes ácidos graxos e uso das mesmas em reações de alcoólise.....	53
Preparo do meio de cultivo e aparato experimental.....	56
Especificidade aos substratos de esterificação.....	57
Alcoólise de óleo vegetal utilizando lipases como catalisadores.....	57
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1 TEOR DE UMIDADE DO SUBSTRATO.....	59
4.2 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES COM ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO.....	59
4.3 ESTUDO DE VARIÁVEIS NA PRODUÇÃO DE LIPASE PELOS FUNGOS PREVIAMENTE SELECIONADOS.....	61
4.3.1 Fungo O <sub>5</sub> ( <i>Aspergillus</i> sp.).....	61
4.3.2 Fungo E <sub>13</sub> ( <i>Trichoderma</i> sp.).....	63
4.3.3 Fungo <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	66
Planejamento Fatorial Fracionário 2 <sup>4-1</sup> .....	66
Planejamento Fatorial Completo 2 <sup>3</sup> .....	69
4.3.4 Fungo <i>Aspergillus niger</i> (O4).....	72
Planejamento Fatorial Fracionário 2 <sup>4-1</sup> .....	72
Planejamento Fatorial Completo 2 <sup>2</sup> .....	75

4.4 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DAS LIPASES FRENTE A DIFERENTES ÁCIDOS GRAXOS E USO DAS MESMAS EM REAÇÕES DE ALCOÓLISE.....	80
5 CONCLUSÕES .....	89
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	92

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2- ETAPAS DO DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	47
FIGURA 3- CONDIÇÕES DE PH DO MEIO DE CULTIVO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DA ENZIMA E ATIVIDADES DE ESTERIFICAÇÃO PARA O <i>ASPERGILLUS NIGER</i> (O <sub>4</sub> ). .....	54
FIGURA 4- CONDIÇÕES DE PH DO MEIO DE CULTIVO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DA ENZIMA E ATIVIDADES DE ESTERIFICAÇÃO PARA O <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> .....	55

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- IDENTIFICAÇÃO E GÊNERO DOS MICRORGANISMOS UTILIZADOS PARA A SELEÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE LIPASES COM ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO .....	49
TABELA 2- RESULTADOS DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DOS FUNGOS O <sub>4</sub> ( <i>ASPERGILLUS NIGER</i> ), O <sub>5</sub> ( <i>ASPERGILLUS SP.</i> ), E <sub>13</sub> ( <i>TRICHODERMA SP.</i> ) E <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> .....	59
TABELA 3- RESULTADOS DAS ATIVIDADES DE ESTERIFICAÇÃO DO FUNGO O <sub>5</sub> ( <i>ASPERGILLUS SP.</i> ) OBTIDOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2 <sup>4-1</sup> .....	62
TABELA 4- RESULTADOS DAS ATIVIDADES DE ESTERIFICAÇÃO DO FUNGO E <sub>13</sub> ( <i>TRICHODERMA SP.</i> ) OBTIDOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2 <sup>4-1</sup> .....	64
TABELA 5- RESULTADOS DAS ATIVIDADES DE ESTERIFICAÇÃO DO FUNGO <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> OBTIDOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2 <sup>4-1</sup> .....	67
TABELA 6- EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS SOBRE A ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO NOS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2 <sup>4-1</sup> PARA O FUNGO <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> .....	68
TABELA 7- RESULTADOS DAS ATIVIDADES DE ESTERIFICAÇÃO DO FUNGO <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> OBTIDOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 <sup>3</sup> .....	71
TABELA 8- RESULTADOS DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DO FUNGO <i>ASPERGILLUS NIGER</i> (O <sub>4</sub> ) OBTIDOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2 <sup>4-1</sup> .....	74
TABELA 9- EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS SOBRE A ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO NOS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2 <sup>4-1</sup> PARA O FUNGO <i>ASPERGILLUS NIGER</i> (O <sub>4</sub> ) .....	75
TABELA 10- RESULTADOS DAS ATIVIDADES DE ESTERIFICAÇÃO DO FUNGO <i>ASPERGILLUS NIGER</i> (O <sub>4</sub> ) OBTIDOS NO PRIMEIRO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 <sup>2</sup> .....	76
TABELA 11- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA AS ATIVIDADES DE ESTERIFICAÇÃO NO TEMPO DE 96H OBTIDAS PELO FUNGO <i>ASPERGILLUS NIGER</i> (O <sub>4</sub> ) NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 <sup>2</sup> .....	77
TABELA 12- EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS SOBRE A ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO NOS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 <sup>2</sup> PARA O FUNGO <i>ASPERGILLUS NIGER</i> (O <sub>4</sub> ) .....	78
TABELA 13- RESULTADOS DAS ATIVIDADES DE ESTERIFICAÇÃO DO FUNGO O <sub>4</sub> <i>ASPERGILLUS NIGER</i> (O <sub>4</sub> ) OBTIDOS NO SEGUNDO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 <sup>2</sup> .....	79
TABELA 14- RESULTADOS DAS ATIVIDADES DE ESTERIFICAÇÃO DO FUNGO <i>ASPERGILLUS NIGER</i> (O <sub>4</sub> ) .....	80

TABELA 15- RESULTADOS DAS ATIVIDADES DE ESTERIFICAÇÃO DO FUNGO *ASPERGILLUS FUMIGATUS*. ..... 84

TABELA 16- CONVERSÕES OBTIDAS NA ALCOÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE SOJA EM SOLVENTE ORGÂNICO DO FUNGO *ASPERGILLUS NIGER* (O<sub>4</sub>) E *ASPERGILLUS FUMIGATUS*. ..... 85

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1-APLICAÇÕES DE LIPASES DE ACORDO COM O TIPO DE REAÇÃO CATALISADA.....	39
---	----

## 1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia é hoje um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado, onde se destaca a tecnologia enzimática. As enzimas, além de serem ativas e versáteis, catalisam uma série de transformações de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reações, o que as difere dos catalisadores não enzimáticos. As enzimas catalisam as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas, o que é comum em síntese química, devido a sua especificidade (DZIEZAK, 1991; PATEL, 2002; PIZARRO e PARK, 2003)

As lipases são enzimas hidrolíticas responsáveis pela catálise de reações que envolvem a hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis (TAG), fornecendo diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG), glicerol e ácidos graxos livres, onde em meios restritos de água ocorre à catálise inversa da reação, a esterificação (HOUDE *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2008).

As lipases são biocatalisadores de importância em diferentes áreas, podendo catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito (KRIEGER *et al.*, 1999; PANDEY *et al.*, 1999; SAXENA *et al.*, 1999). O potencial de aplicações industriais que as lipases possuem abrange a indústria de alimentos como aditivos (modificação de aromas), química fina (síntese de ésteres), detergentes (hidrólise de gorduras), tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas), couro (remoção de lipídios das peles dos animais), farmacêutica e a área médica (remédios, digestivos e enzimas para diagnósticos) (BURKERT *et al.*, 2004)

As lipases microbianas têm recebido grande atenção com o rápido desenvolvimento da tecnologia das enzimas (SNELLMAN *et al.*, 2002) pois constituem um grupo de importantes enzimas de aplicações biotecnológicas e química orgânica (TREICHEL *et al.*, 2010), devido principalmente à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática, incluindo ampla especificidade pelo substrato, régio-enâncio seletividade na resolução de misturas racêmicas, além de facilidade de produção em grande quantidade (HASAN *et al.*, 2006; DUTRA *et al.*, 2008; RAJENDRAN e THANGAVELU, 2009), estabilidade a altas temperaturas e ampla faixa de pH, o que tornam essas enzimas atraentes e versáteis.

As lipases de origem microbiana podem ser obtidas por fermentação em estado sólido (FES) utilizando várias espécies de microrganismos como os fungos filamentosos e leveduras. São mais utilizadas por sua relativa facilidade de produção e abundância de microrganismos

capazes de sintetizá-las (KRIEGER *et al.*, 1999; PANDEY *et al.*, 1999; SAXENA *et al.*, 1999). Este modo de cultura oferece vantagens como maior concentração na recuperação do produto, menor geração de resíduos, redução do consumo de água, e a possibilidade de utilização de subprodutos como substrato (DUTRA *et al.*, 2008). A utilização de subprodutos agroindustriais como fonte de nutrientes e suporte para o desenvolvimento do microrganismo, além de agregar valor a materiais de baixo custo no mercado pode vir a reduzir em muito o preço final da enzima. Na FES o uso de resíduos agroindustriais como farelos e cascas de trigo, arroz, soja, milho, bagaço de mandioca e de cana-de-açúcar, entre outros, são de extrema importância, porque auxiliam na resolução de problemas de poluição ambiental, e ainda tornam a fermentação com um custo mais baixo, devido ao baixo valor comercial destes resíduos (CASTILHO *et al.*, 2000).

As enzimas disponíveis comercialmente apresentam ainda custo elevado. Assim, a busca por processos de produção de lipases que possam diminuir os custos finais das enzimas são de grande interesse. Desta forma, torna-se interessante a busca de microrganismos hábeis a produzir lipases, mas estes, por sua vez requerem condições específicas de processo, pois as lipases obtidas de diferentes fontes podem apresentar diferentes propriedades (SAXENA *et al.*, 2003).

Assim, estudos sobre a utilização de diferentes microrganismos, suplementos e substratos para a produção de lipases em meio sólido podem contribuir no sentido de encontrar combinações ideais para se obter extratos enzimáticos com alta atividade, utilizando substratos e condições operacionais que possibilitem a redução dos custos do processo de produção (VARGAS *et al.*, 2008). Percebe-se também a necessidade de estudar os processos biotecnológicos de uma forma mais ampla, tentando interrelacionar estratégias e procedimentos adequados, desde as etapas de otimização da produção até a aplicação final da enzima, com o intuito de reduzir custos e melhorar a qualidade final do produto (MALDONADO, 2006).

Com base nestes aspectos, o objetivo geral deste trabalho foi realizar a produção de lipases com atividade de esterificação via fermentação em estado sólido a partir de fungos filamentosos isolados de solo e efluente.

Os objetivos específicos foram:

a) Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases com atividade de esterificação a partir de cepas isoladas de solo contaminado com óleo diesel e efluente de indústria de laticínios;

b) Avaliação da influência das variáveis como a umidade, a concentração de uréia e óleo de soja (fontes de nitrogênio e indutor) e a proporção de farelo e casca de soja no meio de cultivo, sobre a produção de lipases com atividade de esterificação a partir dos fungos selecionados na etapa de triagem;

c) Avaliação da especificidade das lipases em relação aos ácidos graxos (oleico, butírico e láurico) para a reação de esterificação a partir de duas formas de produção da enzima (meio de cultivo sem e com ajuste de pH para 4,5) e duas formas de obtenção da enzima (extração em meio líquido seguido de liofilização e liofilização direta do farelo fermentado);

d) Avaliação da aplicação das lipases com atividade de esterificação na reação de alcoólise de óleo vegetal.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 LIPASES

As enzimas são proteínas especializadas que têm a capacidade de acelerar as reações químicas que ocorrem nos tecidos vivos, diminuindo a energia de ativação necessária para a ocorrência da reação. São biocatalisadores que realizam uma série de transformações de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reação, o que as difere dos catalisadores convencionais, ou seja, apresentam alto grau de especificidade por seus substratos, catalisando reações em soluções aquosas e em condições muito suaves de temperatura e pH. Com a utilização de enzimas é possível uma maior facilidade de regular a atividade enzimática, pois para isso basta modificar a natureza do meio de reação, alterar o pH ou adicionar suplementos. (DZIEZAK, 1991; RIEGEL, 1996; LEHNINGER, 2002; PATEL, 2002; PIZARRO e PARK, 2003).

A catálise enzimática apresenta algumas vantagens sobre a catálise química ou térmica, uma vez que pode ser realizada em temperaturas mais brandas, o que evita a degradação de produtos e diminui os gastos energéticos. Além disso, as enzimas são biodegradáveis, logo, menos poluentes para o meio ambiente do que os catalisadores químicos (FREIRE e CASTILHO, 2000).

As lipases são enzimas pertencentes à família das hidrolases e têm como função biológica realizar a hidrólise de triacilgliceróis insolúveis, gerando mono e diacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos livres (CARVALHO *et al.*, 2003).

As lipases (EC 3.1.1.3) são inicialmente caracterizadas pela capacidade de hidrolisar os triglicerídeos na interface óleo-água, mas estas enzimas também funcionam em ambiente não-aquoso, catalisando a hidrólise e a síntese de ésteres formados por glicerol e ácidos graxos de cadeia longa (SHARMA *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2008). Em condições em que a disponibilidade de água no meio é reduzida, a maioria das lipases pode exercer sua atividade catalítica reversa, catalisando também reações de esterificação e transesterificação, entre outras (SHARMA *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2008).

Nas reações de esterificação sua enantiosseletividade pode ser modulada e frequentemente melhorada quando comparada com a reação hidrolítica (CHEN e SIH, 1989; TAWAKI e KLIBANOV, 1999). Embora a síntese de ésteres possa ser quimicamente

catalisada por ácidos ou bases, o uso da tecnologia enzimática oferece vantagens ambientais e uma redução no consumo de energia (HILAL *et al.*, 2006).

As lipases geralmente não requerem cofatores, atuam em uma ampla faixa de pH, são relativamente estáveis a altas temperaturas, apresentam especificidade, regiosseletividade, quimiosseletividade e enâncio-seletividade (PANDEY *et al.*, 1999; GANDHI, 1997).

A aplicação das lipases é selecionada com base em sua especificidade pelo substrato. Ela apresenta uma especificidade posicional e seletividade no que diz respeito à estrutura ou ao comprimento das cadeias lipídicas. As reações catalisadas por lipases ocorrem na camada interfacial hidrofóbica e hidrofílica, e devido a limitação da camada interfacial, as reações de lipase em sistema aquoso geralmente procedem de maneira lenta e os rendimentos do produto são normalmente baixos (SAXENA *et al.*, 1999).

### **2.1.1 Fontes de lipases**

As lipases podem ser encontradas em células de tecidos animais e vegetais e podem ser produzidas por microrganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras. (SHARMA *et al.*, 2001; PASTORE *et al.*, 2003). As quantidades de enzimas produzidas por microrganismos, em geral são muito mais elevadas do que as fontes vegetais e animais, pois a fácil extração das enzimas de microrganismos torna os processos a jusante menos difíceis e com baixo custo de processamento. (IBRAHIM, 2008).

As lipases provenientes de microrganismos constituem um grupo de enzimas de aplicação biotecnológica, devido à sua maior estabilidade e diversidade quando comparadas às lipases de outras fontes, à facilidade de produção em massa, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial, e à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato, isto porque os microrganismos utilizam uma variedade de substrato para seu crescimento e produção de bioprodutos (HASAN *et al.*, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2008).

As lipases microbianas apresentam uma série de vantagens se comparadas as de origens animal e vegetal, uma vez que são enzimas extracelulares em sua grande maioria, sendo facilmente separadas do micélio por filtração ou centrifugação. Ainda, possuem alta velocidade de síntese e alto rendimento de conversão de substrato em produto. São enzimas termoestáveis e apresentam versatilidade e simplicidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva (ESSAMRI *et al.*, 1998; JESUS *et al.*, 1999; DOMINGUÉZ *et al.*, 2003; SHARMA *et al.*, 2001).

Lipases provenientes de distintas fontes microbianas normalmente apresentam uma ampla faixa de propriedades dependentes da fonte produtora, relacionada ainda com a especificidade posicional, especificidade ao substrato, estabilidade em solventes orgânicos, termoestabilidade, pH ótimo, entre outros. A temperatura de estabilidade é uma das mais relevantes características para aplicação industrial dos biocatalisadores (TREICHEL *et al.*, 2010; MAHADIK *et al.*, 2002).

A busca por novas fontes de lipases é justificada pela grande variedade de aplicações futuras que exigem não somente a especificidade enzima-substrato, mas também a estabilidade do processo tais como a tolerância ao pH e larga e alta estabilidade térmica (SAXENA *et al.*, 2003). Assim, esta busca por novas fontes de lipases com diferentes características estimula o isolamento e seleção de novas cepas. Microrganismos 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).

Alguns fungos produtores de lipases pertencem 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.

### **2.1.2 Produção de lipases**

As lipases têm sido produzidas tradicionalmente por fermentação submersa (FS). Entretanto, a fermentação em estado sólido (FES) pode ser uma alternativa muito interessante quando se utiliza como meio de fermentação resíduos de baixo custo. Na FES, o microrganismo cresce em substratos sólidos umedecidos ou suportes inertes, na ausência de água livre, e na FS, os substratos são dissolvidos em meio líquido (GOMBERT *et al.*, 1999; PALMA *et al.*, 2000).

A produção de lipases microbianas envolve o uso de lipídios ou substâncias (triglicerídeos, ácidos graxos e detergente, etc) relacionadas individualmente ou em conjunto com os açúcares como fonte de carbono e/ou como indutor da produção (SHARMA *et al.*, 2001). Os ambientes oleosos (esgoto, locais de despejo de lixo e efluentes, produção de óleo) podem proporcionar um bom ambiente lipolíticos para o isolamento de microrganismos produtores de lipases (RAHMAN *et al.*, 2007).

O processo em meio sólido é bastante característico, sendo definido como qualquer processo de fermentação realizado em um material não solúvel que atua tanto como suporte físico e fonte de nutrientes na ausência ou quase ausência de água livre, sendo assim próximo do ambiente natural em que os microrganismos são adaptados (PANDEY *et al.*, 2000b; ALONSO, 2001; PANDEY, 1992). A baixa umidade significa que a fermentação só pode ser efetuada por um número limitado de microrganismos, principalmente leveduras e fungos, embora algumas bactérias também têm sido usados (PANDEY *et al.*, 2000a).

Os processos em estado sólido possuem um grande potencial para produção de enzimas. Devido à rica natureza orgânica, os resíduos agroindustriais podem servir como um substrato ideal para processos microbianos no desenvolvimento de produtos com alto valor agregado. Estes processos fornecem não somente os nutrientes para cultura, mas também servem como suporte das células microbianas (PANDEY *et al.*, 2000a), logo, a utilização destes resíduos oferece alternativas para substratos e também ajuda na resolução de problemas de poluição (PANDEY *et al.*, 1999).

Assim, o substrato sólido pode ser usado como suporte de apoio para o crescimento do microrganismo, uma vez que o microrganismo se desenvolve na superfície do meio sólido, como também servir como fonte de carbono e fonte de energia (ALONSO, 2001). O microrganismo não cresce somente na superfície do meio sólido, mas também penetra nos espaços entre as partículas do suporte. Por esta razão é que os resíduos agroindustriais são empregados não somente como suporte da fermentação, mas também como fonte de nutrientes para o microrganismo (DOMINGUEZ *et al.*, 2003).

O uso de resíduos agroindustriais oferecem a vantagem de combinar o uso de um substrato barato, sendo uma maneira interessante de melhorar o valor desses resíduos. Inúmeros subprodutos gerados por agroindústrias têm sido utilizados como substratos incluindo o bagaço de cana, farelos e palha trigo e arroz, polpa de beterraba e polpa de café (NIGAM e SINGH, 1994; PANDEY *et al.*, 1999; DI LUCCIO *et al.*, 2004; COUTO e SANROMÁN, 2006).

Os estudos baseados no uso de diferentes microrganismos, suplementos e substratos para produção de lipase podem contribuir para encontrar uma combinação ideal para a obtenção de lipases de elevado valor, utilizando substratos e condições operacionais que facilitem a redução dos custos de produção em escala industrial (VARGAS *et al.*, 2008).

A FES possui muitas vantagens sobre a fermentação submersa, tais como o uso de matérias-primas baratas como substratos, menor necessidade de energia e de espaço, redução de custos de capital, equipamentos mais simples, mais produtividade e facilidade no processo

de “downstream” (PANDEY *et al.*, 1999; PANDEY, 2003), menor probabilidade de contaminação do meio pela menor quantidade de água presente e a possibilidade de obtenção da enzima extracelular mais concentrada (ALONSO, 2001). Assim, a fermentação em estado sólido (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.*, 2000a).

Dessa forma, a fermentação em estado sólido permite um maior nível de produtividade, baixo nível de repressão catabólica, baixo consumo energético, maior estabilidade das enzimas excretadas e baixos investimentos de capital, já que permite o uso de resíduos agroindustriais como meios de cultura, empregando assim baixo custo de matérias-primas e contribuindo para resolver problemas relacionados com o descarte desses materiais no meio ambiente (CASTILHO *et al.*, 2000).

Existem poucos projetos disponíveis na literatura para reatores operando em condições de estado sólido. Isto ocorre principalmente devido a diversos problemas encontrados no controle de diferentes parâmetros tais como pH, temperatura, aeração, transferência de oxigênio, umidade e baixa homogeneidade do meio, sendo estas questões que dificultam a produção de substâncias de interesse em grande escala (ALONSO, 2001; COUTO e SANROMÁN, 2006). Entre os fatores limitantes da FES que requerem soluções para o escalonamento do processo destacam-se a formação de gradientes de umidade, pH, temperatura, oxigênio e distribuição do inóculo e do substrato, isto pela dificuldade de mistura (RODRIGUEZ *et al.*, 2006; HOLKER e LENZ, 2005; CHEN *et al.*, 2005; COUTO e SANROMÁN, 2006; HOLKER *et al.*, 2004; RAGHAVARAO *et al.*, 2003).

No processo fermentativo em estado sólido ocorrem dificuldades de controle de transferência de calor e massa, causados pela compactação do meio, criação de caminhos preferenciais, que por sua vez levam a uma aeração deficiente. Mas estes problemas podem ser minimizados através de estratégias como a circulação de ar ao redor do leito do substrato e uma agitação moderada do leito, uma vez que fungos que não apresentam septo nas hifas e podem ser pouco resistentes à agitação mecânica (VARGAS *et al.*, 2008).

Os parâmetros biológicos do processo, como efeito da composição de nutrientes do meio em termos da fonte de carbono, nitrogênio, sais e indutores, temperatura, valores de pH, umidade, concentração do inóculo e ainda a porosidade do meio são parâmetros muito importantes na produção de enzimas por FES (RIGO, 2009).

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

A temperatura utilizada na fermentação é um fator limitante. No início da fermentação, a temperatura e a concentração do oxigênio são iguais em todo leito, mas com o decorrer do processo, surgem problemas na difusão de oxigênio e transferência de calor, devido à compactação e encolhimento do meio, assim, o calor e gases gerados tendem a se acumular no leito, formando gradientes. Este problema pode afetar o controle da temperatura e do 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 *et al.*, 2008).

O metabolismo do fungo pode alterar o pH, seja pela absorção de ânion ou cátion ou pela produção de ácidos orgânicos ou amônia. Durante o cultivo, o tamponamento é difícil de ser obtido, pois as próprias substâncias usadas como tampões podem ser assimiladas ou podem ser tóxicas naquelas quantidades que seriam necessárias para se conseguir efetivo tamponamento (GONÇALVES, 2007). Na produção de lipases fúngicas, geralmente, a produção máxima de enzimas ocorre quando o pH atinge valores entre 7,0 e 8,0 (CASTILHO *et al.*, 2000).

A porosidade do meio de fermentação em estado sólido e a área superficial são fatores investigados em pesquisa durante a fermentação com *Aspergillus oryzae* em farelo de trigo e grãos de trigo. Existe uma importante relação entre a taxa de oxigênio distribuído e o espaço entre as partículas de substrato (meio), logo, o aumento da porosidade através do uso de menores ou um maior número de partículas do substrato é uma forma de facilitar os processos de transferência durante a fermentação (RAHARDJO *et al.*, 2005).

Inúmeros fatores podem afetar o processo de produção de lipases, os quais vão desde o microrganismo utilizado, a composição do meio (fonte de carbono, fonte de nitrogênio, sais e indutores) e as condições operacionais como umidade, pH, temperatura, aeração, agitação e tipo de impulsor utilizado na fermentação. Os microrganismos são muito versáteis, porém bastante sensíveis às condições do ambiente ao qual estão sendo submetidos (ALONSO, 2001; PINHEIRO *et al.*, 2008).

### **Microrganismos utilizados na produção de lipases por FES**

Há muitos microrganismos conhecidos para produzir diferentes lipases (IIZUMI *et al.*, 1990), entretanto, linhagens taxonomicamente próximas podem produzir lipases de diferentes tipos. Muitos microrganismos como fungos filamentosos, bactérias e leveduras são conhecidos como bons produtores de lipases, tais como os fungos dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Candida*, *Yarrowia*, *Rhizomucor* e *Rhizopus* (CORDOVA *et al.*, 1998).

As leveduras e fungos são largamente empregados em FES para a produção de inúmeros bioprodutos, devido a sua capacidade de se desenvolver em baixas atividades de água. Porém, muitos bioprocessos têm retratado com sucesso o uso de bactérias para a obtenção principalmente de enzimas extracelulares (PANDEY *et al.*, 2000a; HOLKER e LENZ, 2005; BABU e SATYNARAYANA, 1996). Os fungos filamentosos são as melhores espécies, devido à sua capacidade de utilizar substratos variáveis e crescimento vigoroso com a colonização (XU *et al.*, 2002).

Os microrganismos produtores de lipases apresentam uma ampla faixa de temperatura de crescimento. Em geral, fungos e leveduras têm uma temperatura ótima entre 22 e 30 °C (TOIDA *et al.*, 1998).

A fermentação em estado sólido é atualmente o melhor método de obtenção de esporos fúngicos por hifas aéreas. As propriedades dos esporos produzidos em FES diferem daqueles obtidos na fermentação submersa. Esporos de fungos usados como agentes de biocontrole contra fungos patógenos de plantas, por exemplo, *Botrytis cinera*, *Sclerotinia sclerotiorum* ou fungos de podridão branca, são produzidas, preferencialmente por FES, isto porque os esporos obtidos são de melhor qualidade, são mais resistentes à dessecação e são mais estáveis em estado seco (DESHPANDE, 1999; TENGARDY e SZAKACS, 2003).

No caso específico da produção de lipase via FES, muitas pesquisas são realizadas utilizando culturas fúngicas para fermentação, como *Penicillium restrictum* (AZEREDO *et al.*, 2007; PALMA *et al.*, 2000; CASTILHO *et al.*, 2000; GOMBERT *et al.*, 1999), *Penicillium simplicissimum* (VARGAS *et al.*, 2008; GUTARRA *et al.*, 2007; CAVALCANTI *et al.*, 2005; DI LUCCIO *et al.*, 2004), *Penicillium verrucosum* (KEMPKA *et al.*, 2008), *Aspergillus oryzae* (RAHARDJO *et al.*, 2005), *Rhizopus oligosporous* (UI-HAQ *et al.*, 2002), *Rhizopus homothallicus* (DIAZ *et al.*, 2006; RODRIGUEZ *et al.*, 2006), *Rhizopus rhizopodiformis* (CORDOVA *et al.*, 1998), *Aspergillus niger* MTCC 2594 (MALA *et al.*, 2007).

Sharma *et al.* (2001) citam inúmeras cepas de fungos como boas produtoras de lipases, incluindo os gêneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor* e *Rhizopus*.

### **Composição do meio de cultivo na produção de lipases por FES**

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

A natureza do substrato sólido é o fator mais importante, e sua seleção depende de vários fatores, principalmente relacionados com custo e disponibilidade e, portanto, pode envolver a triagem de vários resíduos agroindustriais. Portanto, na fermentação em estado sólido o tipo de substrato utilizado pode aumentar a produção de enzimas, como a utilização de resíduos agroindustriais ricos em ácidos graxos, triglicerídeos e/ou açúcares. Na FES o substrato sólido não só fornece os nutrientes para a cultura, mas também serve como um ponto de ancoragem para a células microbianas. Entre os vários fatores, importantes para o crescimento e atividade microbiana em um determinado substrato, o tamanho de partícula, o nível de umidade/água atividade são os mais críticos (ECHEVARRIA *et al.*, 1991; LIU e TZENG, 1999; PANDEY *et al.*, 1994; PASTRANA *et al.*, 1995).

A seleção de um material sólido que favoreça o desenvolvimento dos microrganismos é um aspecto chave para a FES. Este material pode atuar como fonte de nutrientes (substrato) ou como suporte para o crescimento microbiano. O substrato deve combinar baixa atividade de água com altas taxas de transferência de oxigênio; e também deve favorecer o processo fermentativo para que se consiga atingir as metas do trabalho (PANDEY, 2003). A granulometria destes substratos é uma variável que deve ser bem controlada para se obter uma maior eficiência do processo fermentativo. Partículas menores apresentam uma maior área de contato entre o microrganismo, porém, partículas menores levam uma maior compactação do meio, dificultando a transferência de oxigênio (GONZÁLEZ *et al.*, 1993).

Geralmente, as partículas menores de substrato proporcionam uma maior área de superfície para o ataque microbiano, mas se forem demasiado pequenas podem resultar em aglomeração do substrato, bem como crescimento deficiente. Enquanto que as partículas

maiores podem proporcionar um melhor aeração, mas uma superfície limitada para o ataque microbiano. Portanto, um tamanho das partículas deve ser selecionado para cada processo em particular (PANDEY *et al.*, 1999).

A porosidade do leito da fermentação em estado sólido e a área superficial são fatores investigados em pesquisa durante a fermentação com *Aspergillus oryzae* em farelo de trigo e grãos de trigo, ou seja, há uma importante relação entre a taxa de oxigênio distribuído e o espaço entre as partículas de substrato. Assim, o aumento da porosidade do leito através do uso de menores ou um maior número de partículas do substrato é uma forma de facilitar os processos de transferência durante a fermentação em estado sólido (RAHARDJO *et al.*, 2005).

Na formulação do meio de cultivo da fermentação em estados sólido para produção de lipases, várias fontes de carbono (substrato principal) são utilizadas, entre elas, o farelo de trigo (ELLAIAH *et al.*, 2004), farelo de arroz (ELLAIAH *et al.*, 2004), farelo de cevada (DOMINGUEZ *et al.*, 2003), bagaço de cana-de-açúcar (CORDOVA *et al.*, 1998; ELLAIAH *et al.*, 2004), torta de côco (BENJAMIN e PANDEY, 2000), torta de soja (VARGAS *et al.*, 2008), torta de babaçu (PALMA *et al.*, 2000; GOMBERT *et al.*, 1999; CASTILHO *et al.*, 2000), entre outros, além da incorporação opcional de alguma fonte de carbono indutora para a produção de lipases (óleos, ácidos graxos, detergentes). Em alguns casos, fontes de nitrogênio complementar são utilizadas: água de maceração de milho, extrato de levedura, uréia, sais de amônio e outros. Sais metálicos e micro-elementos podem ser suplementados para suprir as necessidades do microrganismo (ALONSO, 2001).

As tortas residuais de processos de extração de óleos são bastante usadas na indústria de alimentos para animais, por possuírem boas quantidades de proteína. Muitos estudos têm avaliado o uso das tortas de oleaginosas em bioprocessos. Na produção de enzimas as tortas são usadas como substratos para FES ou como suplemento do meio de produção, em termos de fonte carbono e nitrogênio (RAMACHANDRAN *et al.*, 2007).

As composições de meios fermentativos tem sido de grande importância, uma vez que a busca por composições que levem a uma maior produção de enzimas é um dos principais objetivos, logo, a seleção de um substrato próprio é um aspecto chave da FES. Dessa forma, torna-se necessário a obtenção de meios de cultivo completos, mas com o menor número de suplementos possíveis, logo, os resíduos agroindustriais podem ser meios que supram essas condições.

Substratos lipídicos e seus metabólitos (ácidos graxos de cadeia longa) participam da síntese das lipases. Os outros substratos não relacionados à gordura e óleos podem

proporcionar um bom crescimento celular, mas não para a síntese, enquanto os substratos lipídicos, principalmente os ácidos graxos, são excelentes indutores de lipase (LOTTI *et al.*, 1998; DALMAU *et al.*, 2000). Com a adição de diferentes substratos lipídicos (óleo de girassol, de milho e de oliva) ao meio de cultura, aumentou a produção de lipase em quantidades que variaram de acordo com o substrato empregado (DOMINGUEZ *et al.*, 2003). O carbono e o oxigênio são fornecidos sob a forma de compostos orgânicos, de dióxido de carbono, de oxigênio molecular e de água. Já o nitrogênio sob a forma orgânica ou inorgânica, e os outros elementos (S, P, Mg e K) são fornecidos sob a forma de sais (COLEN *et al.*, 2006).

As substâncias ou elementos retirados do ambiente e usados para construir novos componentes são chamados nutrientes, os quais se dividem em macronutrientes e micronutrientes. Ambos os tipos são imprescindíveis, mas os macronutrientes são necessários em grandes quantidades por serem os principais constituintes dos compostos orgânicos celulares. Os macronutrientes incluem carbono, oxigênio, hidrogênio, nitrogênio, fósforo e enxofre e totalizam cerca de 90 % da composição celular. Os demais 10 % são constituídos pelos micronutrientes: potássio, cálcio, ferro e magnésio (BARBOSA e TORRES, 1998).

Maia *et al.* (2001) relatam que a suplementação dos meios de cultivo com uma solução de minerais contendo  $ZnSO_4$ ,  $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $Fe(NH_4)_2SO_2$ ,  $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ,  $H_3BO_3$  e  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  ocasionou aumento de três vezes na atividade enzimática dos meios contendo os óleos de gergelim e oliva, e de quatro vezes no meio contendo óleo de milho.

Íons como Mg, Fe, Ca, Cu, Co, Na, K, Mn e Zn parecem influenciar positivamente a produção de lipases (SHARMA *et al.*, 2001).

Silva *et al.* (2011) estudaram a produção de lipase por FES produzidas pelo fungo *Penicillium brevicompactum* utilizando como meio de cultivo (substratos-suporte) o farelo de mamona e torta de babaçu suplementados com óleo de soja, e variando a umidade do meio. A máxima atividade de esterificação utilizando torta de babaçu foi encontrada nos ensaios que continham 2 % de óleo de soja e 70 % de umidade, tanto em 72 horas quanto em 96 horas de fermentação, seguido do ensaio com 2 % de óleo de soja e 56 % de umidade (72 horas) e ensaio com 3 % de óleo de soja e 80 % de umidade em 96 horas. Este comportamento reflete que a produção de lipase de esterificação é influenciada diretamente pela umidade do meio. Utilizando o farelo de mamona como meio de cultivo, a máxima atividade de esterificação ocorreu nos ensaios contendo 2 % de óleo de soja e 70 % de umidade, seguido pelo ensaio com 3 % de óleo de soja e 80 % de umidade em 72 horas de fermentação e pelo ensaio com 2

% de óleo de soja e 56 % de umidade em 96 horas; observou-se também que quando utilizou-se concentrações extremas de fonte de carbono ( 1 e 3 %) ocorreu uma inibição.

Falony *et al.* (2006) estudaram a produção de lipases de *Aspergillus niger* usando fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES), em um meio de cultura constituído de farelo de trigo. A máxima atividade lipolítica, 1,46 U/mL, foi obtida durante a fermentação submersa em um meio contendo 2 % (p/v) de glicose e 2 % (p/v) de óleo de oliva. A atividade lipolítica de 4,8 U/mL foi alcançada usando o processo de fermentação em estado sólido com um meio que continha 0,75 % (p/v) de sulfato de amônia e 0,34 % (p/v) de uréia. O pH e temperatura ótimos para a atividade enzimática foram pH 6 e 40 °C, respectivamente, sendo que a enzima apresentou 80 % de sua atividade em meio neutro em temperaturas entre 20 e 30 °C por um período de 24 horas.

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

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

Vargas *et al.* (2008) avaliaram a produção de lipases por *Penicillium simplicissimum* em meio sólido usando torta de soja como substrato. Constatou-se que a maior produção da enzima (30 U/g em 80 horas de fermentação) foi sob as condições de 27,5 °C e 55 % de umidade do meio levando em consideração que a torta de soja é rica em nutrientes e não necessita de adição de suplementos de carbono e nitrogênio para aumentar a produção de lipases.

Em estudos realizados, Dominguez *et al.* (2003) investigaram a produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* viar fermentação em estado sólido. O uso de materiais orgânicos como substrato para a produção de lipases diminuem os custos de produção da enzima e proporciona maiores atividades lipolíticas quando comparado ao uso de suportes sintéticos. A utilização de nozes trituradas como substrato gerou cerca de 69 U/g de atividade enzimática em 10 dias de fermentação, superando os resultados obtidos com farelo de cevada suplementado com óleo de girassol, milho e oliva.

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

Burkert (2003) investigou a produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552 utilizando meio de cultivo contendo peptona como fonte de nitrogênio e óleo de soja como indutor. As condições ótimas da produção da enzima foram 3,58 % de peptona e 0,64 % de óleo de soja.

### **Umidade do meio de cultivo na produção de lipases por FES**

A umidade dos substratos sólidos é considerada um parâmetro fundamental para a transferência de massa (água e solutos) através das células microbianas (PANDEY *et al.*, 2000a). O nível de umidade adequado do substrato sólido é determinado pela natureza do material, pelo tipo de produto final desejado e pela necessidade do microrganismo. Portanto, a determinação da quantidade de líquido necessária para a manutenção da umidade do sistema é fundamental para o sucesso do processo, pois o excesso de líquido no interior da matriz sólida leva a redução da porosidade do leito, diminuindo a difusão do oxigênio, além de propiciar um ambiente mais favorável à contaminação bacteriana e à formação de hifas aéreas. Por outro lado, baixos níveis de umidade no substrato podem prejudicar o crescimento microbiano, uma vez que a difusão dos solutos (nutrientes) e de gás (oxigênio) será comprometida, podendo levar a falta de nutrientes e ao acúmulo de metabólitos inibitórios do crescimento (LONSANE *et al.*, 1985).

O alto conteúdo de umidade inicial na matriz sólida da fermentação mostra-se necessário, uma vez que desde o momento do inóculo até o final da fermentação, este diminuirá devido à evaporação acarretada pelo calor metabólico, ressaltando a necessidade de um balanceamento do conteúdo de água no substrato suporte da FES (CHINN *et al.*, 2008).

De acordo com Schmidell *et al.* (2001), durante a fermentação em estado sólido haverá uma perda de umidade devido à evaporação das atividades metabólicas microbianas. Sendo assim, o teor de umidade inicial do substrato sólido na FES pode variar entre 18 e 85 %, sendo ele estipulado em função do poder de absorção do substrato.

Para se obter um maior controle, pode-se manter a umidade relativa do ambiente entre 90 e 97 % ou, ainda, se as condições operacionais permitirem, adiciona-se ar umidificado ou água estéril ao sistema (LONSANE *et al.*, 1985).

O efeito da água na FES é mais bem indicado pela  $a_w$  (atividade de água), a qual fornece a quantidade de água não ligada ao substrato, disponível, portanto, ao microrganismo, no ambiente em que este se encontra (KIM *et al.*, 1985; HAN *et al.*, 1987).

Mitchell *et al.* (2000) citam a definição de  $a_w$  dos substratos sólidos umedecidos como a relação entre a pressão de vapor da água sobre o substrato (fase gasosa), em um sistema fechado, e a pressão de vapor da água pura, à mesma temperatura.

Para Schmidell *et al.* (2001), a  $a_w$  é um parâmetro que fornece a quantidade de água não ligada viável à disposição dos microrganismos, segundo ele, a atividade de água influencia o desenvolvimento microbiano e os processos bioquímicos. Assim, cada microrganismo tem um nível de  $a_w$  mínimo para que possa efetuar suas atividades metabólicas.

A produção de lipases por *Penicillium simplicissimum* em meio sólido usando torta de soja como substrato foi estudado por Vargas *et al.* (2008). Foi constatado que a maior produção da enzima (30 U/g em 80 horas de fermentação) ocorreu sob as condições de 27,5 °C e 55 % de umidade do meio levando em consideração que a torta de soja é rica em nutrientes e não necessita de adição de fontes suplementares de carbono e nitrogênio para aumentar a produção de lipases.

Alguns estudos para produção de lipase em FES indicaram a necessidade de 70 % de umidade em torta de babaçu (AZEREDO *et al.*, 2007; PALMA *et al.*, 2000) e em farelo de soja (DI LUCCIO *et al.*, 2004). Em FES com bagaço de cana de açúcar a umidade utilizada foi 75 %, alcançando bons resultados de produtividade (RODRIGUEZ *et al.*, 2006).

### **Temperatura e pH de produção de lipases por FES**

A temperatura de crescimento de microrganismo abrange uma larga faixa, havendo espécies psicrófilas, mesófilas e termófilas. Os fungos podem ter morfologia diferente em

função das condições nutricionais e da temperatura de seu desenvolvimento (TRABULSI, 1999).

A temperatura utilizada na fermentação é o fator limitante da altura do leito. Nos estágios iniciais do processo de fermentação, a temperatura e a concentração do oxigênio são iguais em todo leito; no entanto, com o decorrer do processo, surgem problemas na difusão de oxigênio e transferência de calor, por compactação e encolhimento do leito. O calor e gases gerados nas biorreações tendem a se acumular no leito, formando gradientes, os quais podem afetar o controle da temperatura e do 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 *et al.*, 2008).

Ui Haq *et al.* (2002) estudaram temperaturas de cultivo de 25 a 45 °C para a produção de lipases pelo microrganismo *R. oligosporous* por fermentação em estado sólido. Os melhores resultados foram obtidos a 30 °C.

O controle do pH durante a fermentação em estado sólido é um dos parâmetros mais críticos; isto ocorre devido à heterogeneidade e à consistência do material. Sendo assim, a determinação exata do pH, em substratos sólidos é feita com precisão somente no início e no final do processo fermentativo (SCHMIDELL, 2001). Mitchell *et al.* (2000) ressaltam que, devido a este fato, é impossível realizar um controle fino do pH na FES.

Para amenizar o efeito de uma variação brusca do potencial hidrogeniônico, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou a adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato. É importante fazer um ajuste inicial no substrato sólido, geralmente na faixa entre 4,5 e 5,9, adicionando soluções-tampão, que irão, além disso, conferir a umidade ótima do meio (LONSANE *et al.*, 1985).

Schmidell *et al.* (2001) ressaltam que a escolha do tampão ideal é um fator vital para o processo, pois, para o tamponamento em algumas faixas de pH, é necessária a utilização de soluções-tampão orgânicas, que podem ser consumidas pelos microrganismos.

Em geral, a produção máxima de enzimas ocorre quando o pH atinge valores entre 7,0 e 8,0. No final da fermentação, isto é, após o esgotamento da fonte de carbono, o pH continua subindo para a faixa alcalina, provavelmente devido à proteólise que origina aminoácidos que são desaminados, liberando amônia para o caldo fermentativo. Neste estágio, a enzima produzida é rapidamente desnaturada por proteólise ou pH adverso (CASTILHO *et al.*, 2000).

Existem características dos fungos filamentosos que os tornam mais atrativos para utilização na fermentação em estado sólido, como a facilidade de crescimento em meios com baixos valores de pH (MITCHELL *et al.*, 2000).

### **2.1.3 Caracterização das lipases**

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

As lipases devem ser selecionadas para cada aplicação, sendo que estas podem ser baseadas na especificidade do substrato, posição e estereoespecificidade, bem como, temperatura e pH de estabilidade (CARVALHO *et al.*, 2008). Além disso, por ser uma enzima versátil, a lipase apresenta variadas especificidades aos substratos reacionais, assim, a caracterização bioquímica das lipases permite determinar a adequação da enzima para a aplicação em diferentes processos industriais (HASAN *et al.*, 2006).

#### **Especificidade**

As enzimas lipolíticas podem apresentar diferentes tipos de especificidades, tais como de substrato e posicional. A especificidade pelo substrato se refere a diferentes taxas de atividades enzimáticas apresentadas por uma mesma lipase sobre triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos, contendo ácidos graxos de cadeia longa ou curta. A especificidade posicional é proporcionada pela capacidade em hidrolisar ésteres primários e secundários, com ou sem especificidade. A especificidade posicional em relação ao ácido graxo tem grande importância no emprego das enzimas lipolíticas na produção de ácidos graxos livres, a partir de gorduras e óleos, nas reações de interesterificação de óleos e gorduras e na esterificação de ácidos graxos por alcoóis (SABIONI, 2000).

De acordo com Carvalho *et al.* (2003), as lipases têm sido classificadas em três grupos, em função de sua especificidade com relação ao substrato:

a) lipases 1,3 específicas - catalisam a liberação de ácidos graxos especificamente das posições *sn*-1 e *sn*-3 dos acilgliceróis. Ex: *Aspergillus niger* e *Mucor miehei*;

b) lipases não específicas - catalisam a hidrólise de TAG para ácidos graxos livres e glicerol, de modo aleatório. Não mostram especificidade com relação à natureza do grupo acil ou à posição em que este está esterificado no glicerol. Exemplos são as lipases de *Penicilium cyclopium*, *orynebacterium acnes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* e *Candida cylindracea*;

c) lipases ácido graxo específicas - catalisam a hidrólise de tipos específicos de grupos acilas nas moléculas de TAG. Um representante típico deste grupo é a lipase de *Geotrichum candidum* que hidrolisa grupos acila de cadeia longa, que contenham dupla ligação *cis* na posição 9.

A especificidade ao 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). 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. 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).

O solvente pode alterar a especificidade, quimiosseletividade, regioseletividade, seletividade proquiral e enantiosseletividade das lipases e outras hidrolases. Vários modelos foram propostos para explicar a mudança da seletividade destas enzimas em função do solvente. Estes foram baseados na alteração da flexibilidade conformacional do sítio ativo, na partição de grupos funcionais do substrato ou de moléculas de solvente para fora ou para dentro das cavidades do sítio ativo, e na estrutura do solvente (COSTA e AMORIM, 1999).

Os solventes polares (miscíveis em água) causam maior desestabilização das lipases que os solventes apolares (imiscíveis em água), assim, a atividade lipásica pode ser altamente dependente da hidrofobicidade do solvente, relacionando-se este fato à existência ou não da camada de água na superfície da enzima, logo, a manutenção da atividade catalítica pode ser favorecida pelo uso de solventes apolares (HAZARIKA *et al.*, 2002; NAWANI *et al.*, 1998).

Embora uma grande maioria das lipases apresente preferência reacional frente a solventes apolares, são ainda necessárias pesquisas que reportem esta relação (GUPTA, 1992).

Rúa e Ballesteros (1994) ressaltam que as diferenças de atividade obtida por uma mesma lipase em meios reacionais diferentes podem estar relacionadas ao número de moléculas da enzima presente no meio reacional. Logo, a estrutura da lipase pode possuir mecanismos capazes de promover sua adaptação em diferentes ambientes reacionais com diferentes tipos de substratos, e como consequência, obter atividades em diferentes meios reacionais.

A lipase de *Aspergillus carneus* apresentou boas atividades em uma faixa de triglicerídeos variando de C4 a C18 como substrato (SAXENA *et al.*, 2003). Já a lipase alcalina de *Penicillium expansum* apresentou preferência pelo triacilglicerol, mas não teve especificidade pela posição do éster (SZTAJER *et al.*, 1993). Desempenho semelhante foi observado para a lipase de *Pseudomonas fluorescens* HU380, onde a maior atividade foi observada quando utilizou-se triglicerídeo (C4:0) na reação (KOJIMA e SHIMIZU, 2003), bem como para lipase bruta produzida de *Colletotrichum gloesporioides* (COLEN *et al.*, 2006).

Dörmo *et al.* (2004) estudaram a influência do tamanho da cadeia do álcool em reações de esterificação com ácido oleico utilizando a lipase comercial Novozym 435. Os alcoóis investigados foram etanol, n-propanol, i-butanol e i-pentanol. Os maiores rendimentos foram obtidos com alcoóis menos hidrofílicos, ou seja, de maior cadeia.

Estudos realizados por Chulalaksananukul *et al.* (1993) mostram que ocorreu a completa inativação do extrato enzimático quando os autores utilizaram excesso de n-butanol para síntese de butirato de etila, verificando que um excesso de álcool pode agir como um inibidor competitivo na reação de esterificação, impedindo a formação do complexo enzima-ácido.

Silva *et al.* (2011) estudaram a especificidade frente a diferentes alcoóis (metanol, etanol, n-propanol e butanol) e ácidos graxos (ácido laurico- C12:0, oleico- C18:1 e butírico- C4:0) da lipase bruta e pré-purificada liofilizada obtida da FES de *Penicillium brevicompactum* utilizando torta de babaçu e farelo de mamona como substratos. Utilizando a torta de babaçu como substrato, o extrato enzimático bruto e o extrato enzimático concentrado apresentaram maior especificidade por alcoóis de cadeia média (etanol) e ácidos graxos de cadeia longa (ácido oleico) para a atividade de esterificação. Utilizando o farelo de mamona como substrato, o extrato enzimático bruto e o extrato enzimático concentrado apresentaram maior especificidade por alcoóis de cadeia curta (etanol) e ácidos graxos de cadeia curta (butírico) para a atividade de esterificação. Neste mesmo estudo, Silva *et al.* (2011) também avaliaram a especificidade do extrato enzimático com atividade de hidrólise frente a

diferentes triglicerídeos (óleo de oliva, óleo de mamona, óleo de pinhão manso, óleo de dendê, óleo de côco, tributirina e óleo de soja); utilizando a torta de babaçu e o farelo de mamona como substratos, o extrato enzimático bruto e o extrato enzimático concentrado apresentaram maior especificidade por triglicerídeos de cadeia média insaturada (óleo de soja) para a atividade de hidrólise.

### **Estabilidade**

A estabilidade da lipase está obviamente ligada com sua estrutura, que pode ser afetada por mudança de pH ou presença de íons metálicos. Em alguns casos sua desnaturação térmica ocorre quando o desdobramento dos polipeptídeos no sítio ativo fica em estado intermediário (SHARMA *et al.*, 2001; ZHU *et al.*, 2001).

A estabilidade térmica é a capacidade que a enzima solúvel ou imobilizada possui de manter seu potencial catalítico quando submetida a uma dada temperatura por certo tempo (ARROYO *et al.*, 1999). A termoestabilidade de um biocatalisador permite uma maior temperatura operacional, maior estabilidade, maior rendimento de processo e menor risco de contaminação microbiológica (HASAN *et al.*, 2006). Consequentemente, a estabilidade térmica é uma característica desejável para as lipases (SHARMA *et al.*, 2001).

As lipases podem apresentar atividade em pH variando de 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70 °C. Apresentam, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40 °C (CASTRO *et al.*, 2004).

A estabilidade da enzima e a sua atividade em solventes orgânicos dependem não somente das propriedades e concentrações do solvente orgânico, mas também da natureza da enzima. A termoestabilidade das lipases varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (CASTRO *et al.*, 2004), ou seja, as enzimas termoestáveis obtidas a partir de fontes microbianas são altamente vantajosas para aplicações biotecnológicas, já que podem ser produzidas com baixos custos e apresentam alta estabilidade. Dessa forma, há uma grande demanda por enzimas termoestáveis na área industrial (HASAN *et al.*, 2006).

Em baixos teores de água, como é o caso das enzimas liofilizadas, as moléculas de enzima apresentam certa rigidez conformacional, e como consequência, uma maior estabilidade quando submetida a temperaturas elevadas, já que a conformação rígida é mais estável (GUPTA, 1992).

Os fungos termofílicos e termotolerantes são fontes para produzir enzimas com altos níveis de estabilidade térmica. As lipases extracelulares purificadas produzidas pelo fungo termotolerante *Rhizopus homothallicus* em fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm), apresentaram máxima atividade a 40 e 30 °C, respectivamente. A avaliação da estabilidade térmica a 50 °C resultou em tempo de meia-vida de 0,72 e 0,44 horas para os sistemas de FES e FSm, respectivamente (DIAZ *et al.*, 2006).

A lipase de *Aspergillus carneus* apresentou pH e temperatura ótimos de 9,0 e 37 °C, respectivamente, e foi estável na faixa de pH 8 a 10 por 24 horas e por 5 minutos à temperatura de 70 °C (SAXENA *et al.*, 2003).

A termoestabilidade da enzima *Bacillus* sp. foi aumentada pela adição de estabilizadores como etileno glicol, sorbitol e glicerol, fazendo com que sua atividade fosse mantida por 150 minutos a 70 °C (NAWANI e KAUR, 2000).

Lin (1996) relatou que a enzima produzida por *Pseudomonas pseudoalcaligenes F111* em solvente orgânico e adição de íons cálcio manteve 20 % de sua atividade em temperatura de 4 °C por 24 horas.

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

Silva *et al.* (2011) estudaram a estabilidade da temperatura de congelamento (-10 °C) e de geladeira (4 °C) da lipase bruta e pré-purificada liofilizada obtida da FES de *Penicillium brevicompactum* utilizando torta de babaçu e farelo de mamona como substratos. Utilizando a torta de babaçu como substrato, o extrato enzimático bruto, quando mantido a -10 °C a maior atividade hidrolítica foi obtida em 76 dias (96,51 U/g) e a atividade de esterificação em 10 dias (228,54 U/g); já com o extrato mantido a 4 °C, a maior atividade hidrolítica foi obtida em 10 dias (94,83 U/g) e a atividade de esterificação em 30 dias (163,47 U/g). Com o extrato enzimático concentrado mantido a -10 °C a maior atividade hidrolítica foi obtida em 76 dias (125,5 U/g) e a atividade de esterificação em 76 dias (200,90 U/g); já com o extrato mantido a 4 °C, a maior atividade hidrolítica foi obtida em 10 dias (35,3 U/g) e a atividade de esterificação em 20 dias (150,07 U/g). Utilizando o farelo de mamona como substrato, o extrato enzimático bruto, quando mantido a -10 °C a maior atividade hidrolítica foi obtida em 76 dias (96,54 U/g) e a atividade de esterificação em 10 dias (268,50 U/g); já com o extrato mantido a 4 °C, a maior atividade hidrolítica foi obtida em 10 dias (58,23 U/g) e a atividade de esterificação em 30 dias (207,00 U/g). Com o extrato enzimático concentrado mantido a -10 °C a maior atividade hidrolítica foi obtida em 40 dias (52,10 U/g) e a atividade de

esterificação em 20 dias (251,15 U/g); já com o extrato mantido a 4 °C , a maior atividade hidrolítica foi obtida em 10 dias (71,01 U/g) e a atividade de esterificação em 86 dias (96,74 U/g).

#### **2.1.4 Aplicações das lipases**

As enzimas microbianas podem ser classificadas em três grandes campos de aplicação: aquelas que podem ser usadas para sintetizar compostos desejados; aquelas que podem levar a importantes reações de bioconversão; e aquelas que são capazes de hidrolisar polímeros em monômeros de interesse (VRANESIC *et al.*, 2002).

As lipases são utilizadas em diversas aplicações industriais devido à sua capacidade de catalisar diferentes reações, como hidrólise, esterificação e transesterificação (CONTESINI e CARVALHO, 2006). Assim, devido às diferentes reações que são capazes de catalisar, as lipases, além de sua utilização em áreas tradicionais, como na indústria de detergentes e alimentícias, vêm sendo intensamente empregadas nos mais diversos campos industriais (FEIRE e CASTILHO, 2000; SHARMA *et al.*, 2001).

O interesse na produção de lipases microbianas tem aumentado nas últimas décadas, devido ao seu grande potencial de aplicação industrial, uma vez que as lipases apresentam potencial de aplicação industrial em diferentes setores, tais como a indústria de alimentos (modificação de aromas), química fina (síntese de ésteres), na produção de detergentes (hidrólise de gorduras), no tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas), na indústria do couro (remoção de lipídeos das peles dos animais), na farmacêutica e na área médica (remédios, digestivos e enzimas para diagnósticos) (FREIRE, 1996; SHARMA *et al.*, 2001;). Uma das novas aplicações biotecnológicas utilizando lipase é na síntese de biopolímeros e do biodiesel (JAEGER e EGGERT, 2002).

O Quadro 1 apresenta as aplicações de lipases de acordo com o tipo de reação catalisada.

Quadro 1-Aplicações de lipases de acordo com o tipo de reação catalisada

Tipos de reações	Áreas de aplicação	Aplicações	Produtos
Hidrólise	Alimentos (laticínios)	Hidrólise da gordura do leite	Agentes flavorizantes para queijos e derivados
	Química (Processamento do Óleo)	Hidrólise de óleos e gorduras	Ácidos graxos, diglicerídeos e monoglicerídeos (emulsificantes, reagentes para análise de lipídios)
	Química (Detergente)	Remover manchas de óleo	Detergentes para lavanderias e uso doméstico
	Medicina	Dosagem de triglicerídeos no sangue	Kits diagnósticos
Esterificação	Química Fina	Síntese de ésteres	Intermediários quirais ésteres, emulsificantes
	Química de Alimentos	Esterificação ou transesterificação	Óleos ou gorduras, flavorizantes e aromatizantes.
	Química Farmacêutica	Síntese de intermediários de medicamentos	Drogas antiinflamatórias como naproxeno, ibuprofeno, cetoprofen, suprofen.
Transesterificação	Química Fina	Transesterificação de óleos vegetais	Biodiesel

Fonte: FERNANDES, 2007

A utilização de lipases pelas indústrias apresenta vantagens como: estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH, facilidade de separação dos produtos e, quando imobilizada, podem ser submetidas às condições industriais típicas, como em reatores com temperaturas superiores a 70 °C por longos períodos de tempo (HASAN *et al.*, 2006).

As lipases são utilizadas em diversos campos da produção de alimentos, tais como no melhoramento da textura de massas, pela indústria de panificação, na redução do período de maturação de alimentos cárneos e queijos, no desenvolvimento de aromas e sabores, na hidrólise de gorduras do leite, modificação de gorduras presentes em manteigas, na produção de condimentos e essências, na obtenção de margarinas de baixo teor calórico, para o melhoramento de sabor e aroma, desenvolvimento de textura, maturação de queijos, dentre outras aplicações (SHARMA *et al.*, 2001).

As lipases são utilizadas para modificar o sabor dos alimentos pela síntese dos ésteres, dos ácidos graxos e álcool de cadeias curtas, que são os compostos básicos do sabor e aroma. São utilizadas também para a produção de carne de peixe e margarina com reduzido teor calórico, além de atuarem no processo de fermentação de salames e vinhos (HASAN *et al.*,

2006). Na indústria de queijos são empregadas na alteração e intensificação do sabor e em processos de aceleração da maturação (ALONSO, 2001).

A obtenção de ácidos graxos livres a partir da hidrólise seletiva de óleos e gorduras presentes em diversos alimentos pode ser realizada através do uso das lipases. Os ácidos graxos livres podem ou não sofrer modificações químicas e, dependendo do tamanho da cadeia carbônica e do grau de insaturação, conferem um peculiar sabor e aroma para os alimentos, representando um importante papel nas propriedades físico-químicas, sensoriais e nutricionais de diversos produtos (HASAN *et al.*, 2006).

O tratamento de efluentes de diversas origens é uma área de aplicação para as lipases. As lipases surgem como uma excelente alternativa para o tratamento de rejeitos industriais compostos por matéria graxa (ALONSO, 2001).

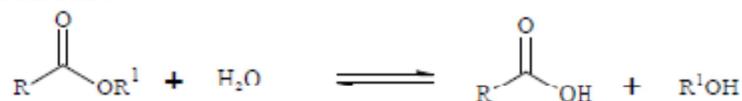
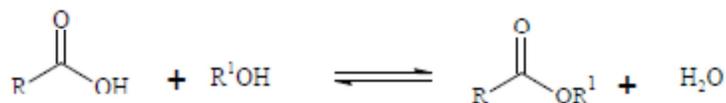
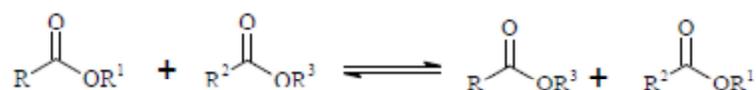
### **Reações de esterificação e transesterificação**

As reações de esterificação e transesterificação são reações catalisadas por lipases (KRISHNA e KARANTH, 2002), e vários produtos importantes, tais como ésteres de sabor (XU *et al.*, 2002), monoacilgliceróis, blocos de construção opticamente puro (GHANEM e ABOUL-ENEIN, 2005), e biodiesel (SHAH *et al.*, 2003), podem ser produzidos por essas reações.

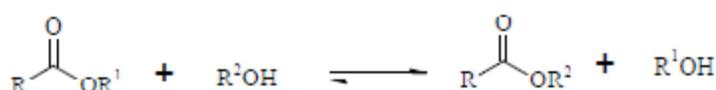
As lipases são eficientes nos meios reacionais e apresentam alta atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos, facilitando a catálise de muitas reações, tais como esterificação, hidrólise, transesterificação, interesterificação, lactonização e aminólise (SUN *et al.*, 2009b; MARTINS *et al.*, 2008). A Figura 1 apresenta as reações catalisadas por lipases.

A esterificação é o processo que possibilita a obtenção de ésteres, os quais são formados a partir da substituição de uma hidroxila (-OH) de um ácido por um radical alcóxila (-OR). O método mais comum é a reação reversível de um ácido carboxílico com um álcool, havendo eliminação de água (BARCZA, 2012). A água gerada durante a reação de esterificação é o mais importante parâmetro que precisa ser controlado. Mesmo sob condições de baixa concentração de água, durante o curso da reação, 1 mol de água é formado para cada mil de éster sintetizado, a formação dessa fase aquosa pode ocorrer facilmente durante a reação (RICHETTI, 2009). Assim, o método mais utilizado em processos industriais para obtenção de ésteres é a reação de esterificação, entretanto, a reação inversa é conhecida como hidrólise (BARCZA, 2012).

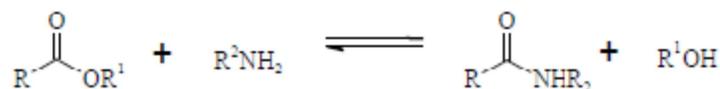
Figura 1- Reações catalisadas por lipases

**Hidrólise****Esterificação****Interesterificação****Transesterificação**

## Alcólise



## Acidólise

**Aminólise****Lactonização**

Fonte: Paques e Macedo, 2006.

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

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

animais) pode ser conduzido por uma variedade de rotas tecnológicas, em que diferentes tipos de catalisadores podem ser empregados (RAMOS *et al.*, 2003).

A reação de esterificação do ácido carboxílico e álcool é difícil em meio aquoso, logo, torna-se facilitada em solventes orgânicos. Diferentes métodos de ensaio de lipase foram desenvolvido para várias finalidades (SANTOS *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2006). A maioria dos métodos são baseados em ensaios de hidrólise. No entanto, um problema ocorre quando as atividades de síntese de enzimas em solventes orgânicos não correspondem com as atividades hidrolíticas em soluções aquosas (WU *et al.*, 1996; TORRES *et al.*, 2003).

Comparado ao meio aquoso, os meios orgânicos apresentam algumas vantagens, como a dissolução dos compostos hidrofóbicos, bem como a possibilidade de transferir equilíbrio termodinâmico para as reações de síntese (esterificação e transesterificação). Os meios orgânicos utilizados para biocatálise enzimática são principalmente de três tipos: sistema bifásico, sistema de micela reversa, e sistema microaquoso (MONOT *et al.*, 1991). Nos sistemas bifásico e de micela reversa, a enzima é solubilizada em água, enquanto que no sistema microaquoso, a enzima, tem na sua proximidade uma certa quantidade de água necessária para ser ativa, esta em suspensão no solvente orgânico. Foi demonstrado que a atividade da lipase é afetada pelo tipo de sistema orgânico usado como o meio de reação (BORZEIX *et al.*, 1992; YANG e RUSSELL, 1995).

O uso de enzimas em sistemas bifásicos ao invés de meio aquoso oferece várias vantagens, como a redução de substrato e / ou inibição do produto, a solubilização de compostos hidrofóbicos, a possibilidade de transferir equilíbrio termodinâmico para a reação desejada e a possibilidade de reutilização das fases separadas para aumentar o número de dobras da enzima (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

A seleção da reação e do substrato adequado é fundamental para um ensaio de atividade. No caso do ensaio da atividade da lipase, a reação deve ser catalisada por lipase em solvente orgânico, e o substrato deve ser detectado por um método simples. A maioria dos substratos para a dosagem de lipase pode apresentar características de absorção somente em um determinado fase aquosa após hidrólise pela lipase, assim, a seleção de um substrato adequado para determinar a síntese da lipase atividade em solvente orgânico tornou-se uma questão fundamental (PENCREACH e BARATTI, 1996).

Condições de crescimento, como a disponibilidade de fontes de carbono e nitrogênio, a presença de ativadores, estimulantes, inibidores, surfactantes, temperatura de incubação, pH, fonte de inóculo (HADEBALL, 1991) e oxigênio (CHARTRAIN *et al.*, 1993) podem influenciar a síntese de lipases.

A esterificação é importante na produção de sabores e aromas, enquanto a transesterificação é, atualmente, de grande interesse para a produção de ésteres de biodiesel. Estas reações são geralmente realizadas quimicamente nas indústrias, no entanto, as rotas químicas têm várias desvantagens, uma vez que envolve a catálise do ácido ou da base, e quaisquer resíduos de ácido ou base no produto são indesejáveis. Além disso, a rota química envolve temperaturas acima da temperatura ambiente, que não só levam a um consumo elevado de energia, mas também podem levar à degradação do produto do éster (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Os ésteres podem ser obtidos através da reação entre álcoois e ácidos carboxílicos (esterificação) com a eliminação de água; das 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) (ADACHI e KOBAYASHI, 2005; GÜVENÇA *et al.*, 2002; CHOWDARY *et al.*, 2001; ALVAREZ-MACARIE e BARATTI, 2000). Ésteres são importantes compostos orgânicos com um número crescente de aplicações comerciais. Estes compostos são amplamente utilizados para a preparação de compostos aromáticos, cosméticos, detergentes, sabores e produtos farmacêuticos. Ésteres a partir de fontes naturais não estão disponíveis em grandes quantidades, e eles são normalmente demasiado caro para serem utilizados em aplicações comerciais. Muitos dos ésteres disponíveis são produzidos por sínteses químicas ou enzimáticas. 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 produtos resultantes de ácidos e álcoois de cadeia curta (2-8 átomos de carbono) são importantes componentes de aromas e flavorizantes utilizados nas indústrias de alimentos, bebidas, cosméticos e medicamentos. Os ésteres resultantes das reações entre ácidos de cadeia longa com álcoois de cadeia curta (2-8 átomos de carbono) são utilizados nas indústrias como aditivos em alimentos, detergentes, cosméticos e em medicamentos (GÜVENÇA *et al.*, 2002). Já os ésteres de sacarose, são conhecidos como bons emulsificantes no campo da indústria alimentar, farmacêutica e cosmética. Os ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, como os oleatos, palmitatos e linolenatos são os principais constituintes do biodiesel (HAZARIKA *et al.*, 2002).

O biodiesel é um potencial substituto ao óleo diesel consistindo de uma mistura de ésteres de ácidos graxos podendo ser produzido pela reação de transesterificação de um triglicerídeo (óleo vegetal ou gordura animal) com um álcool (KUSDIANA e SAKA, 2001).

O biodiesel produzido a partir de vários óleos vegetais possui viscosidade próxima ao do diesel convencional. Os valores de poder calorífico inferior são menores, mas possuem maior número de cetano quando comparado ao diesel de petróleo. Uma vez que, as características do biodiesel são geralmente similares às do óleo diesel, teoricamente, este se constitui em um forte candidato a substituir parcialmente este combustível de origem fóssil, caso sua produção se viabilize economicamente (MACEDO e MACEDO, 2004).

O biodiesel foi definido como os ésteres monoalquílicos de cadeia de ácidos graxos provenientes de matérias-primas renováveis, como óleos vegetais ou gorduras animais. São renováveis, biodegradáveis e não tóxicos (ANDRADE e VASCONCELOS, 2003; XU *et al.*, 2003). O método mais comum para a produção de biodiesel é a transesterificação de óleos ou gorduras com um álcool na presença de um catalisador, o qual pode ser base, ácido ou enzima, ou seja, ocorre a transesterificação direta de óleos e gorduras, onde triglicerídeos reagem com um álcool de cadeia curta, metanol (ou etanol) na presença de um catalisador como o hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, ou lipases (HAMA *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2003).

A tecnologia de produção de biodiesel por hidroesterificação envolve uma primeira etapa de hidrólise do óleo a ácidos graxos livres (AGL) e glicerol e, em seguida, a esterificação desses ácidos graxos com um álcool de cadeia curta. Esse processo pode empregar óleos e gorduras com qualquer teor de ácido graxo e água, diferente do processo tradicional de transesterificação alcalina que exige acidez máxima de 0,5 % e ausência de água na matéria prima, e ainda gera um glicerol de melhor qualidade, uma vez que este não entra em contato com o metanol, que é de elevada toxicidade (ARANDA *et al.*, 2006).

Dentre as vantagens da utilização de biodiesel, podem ser citadas (MACEDO e MACEDO, 2004):

- a) é um combustível não derivado do petróleo, mas proveniente de plantas, portanto sua combustão não eleva o nível atual de CO<sub>2</sub> na atmosfera;
- b) pode ser produzido localmente e em pequenas escalas, reduzindo a importação do petróleo;
- c) é biodegradável;

d) comparativamente, sua combustão produz reduzidos níveis de CO, NO e materiais particulados.

## **2.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Na revisão bibliográfica apresentada neste capítulo, procurou-se apresentar o estado da arte a respeito da produção e aplicação de enzimas de interesse, em especial, as lipases.

Também pode-se citar que o uso de lipases obtidas a partir de microrganismos isolados e pré-selecionados, como catalisadores, apresenta-se como uma rota promissora na área biotecnológica, incluindo o estudo da sua produção em meios de baixo custo, sendo assim, de grande importância a utilização de enzimas não-comerciais.

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo abordar o screening, produção de lipases microbianas produzidas no próprio Laboratório de Biotecnologia de Alimentos-URI-Campus de Erechim e a aplicação dessas enzimas na catálise de reações de interesse para a indústria de química e de alimentos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Os materiais, reagentes e equipamentos utilizados no desenvolvimento dos experimentos são apresentados a seguir:

a) Materiais: erlenmeyers, pipetas, béqueres, proveta, bureta, balão volumétrico, bastão de vidro, gaze, ponteiras, pipetador automático, agitador magnético, placas de petri, papel filtro, alça de platina, filtro de tecido e manta acrílica hidrofóbica;

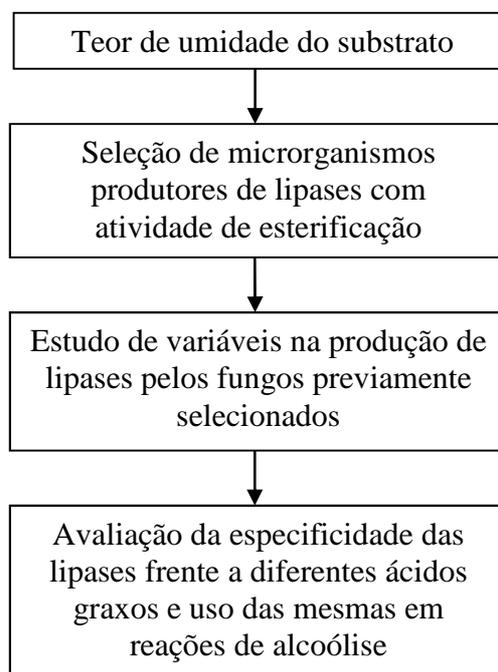
b) Reagentes e substratos: farelo de soja e casca de soja (Olfar- Indústria e Comércio de Óleos Vegetais- Erechim/RS), ágar batata dextrose (Oxoid), óleo de soja (Camera), uréia (Reagen), Tween 80 (Proton), hidróxido de sódio (Nuclear), etanol (Quimex), acetona (Quimex), água destilada, solução de ácido sulfúrico  $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ , ácido oleico, ácido butírico, ácido láurico, tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0, *n*- hexano (Nuclear), *n*-heptano (Nuclear);

c) Equipamentos: autoclave (Prismatec), estufa (De Leo), pHmetro (Digimed), balança analítica (Bel Engineering), agitador magnético (Fisaton), banho Dubnoff Orbital (TE-0532), Freezer -80 °C (Hitachi), liofilizador (Edwards Modulyo), mixer manual (Black & Decker), germinadora para incubação ( Tecnal TE-401), cromatógrafo gasoso.

#### 3.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA

A Figura 2 apresenta as etapas do delineamento da pesquisa

Figura 2- Etapas do delineamento da pesquisa



### 3.2.1 Teor de umidade do substrato

O teor de umidade do farelo de soja e da casca de soja foi realizado utilizando o método de dessecação descrito pelo Instituto Adolfo Lutz.

### 3.2.2 Seleção de microrganismos produtores de lipase com atividade de esterificação

A seleção de microrganismos produtores de lipases com atividade de esterificação, denominada etapa de triagem, foi realizada utilizando fungos isolados por Colla *et al.* (2009). Estes fungos filamentosos foram isolados de solo contaminado com óleo diesel (identificados como fungos  $O_i$ ), e de efluentes de indústria de laticínios (identificados como  $E_i$ ), pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Fusarium*.

Neste estudo foram utilizados um total de 16 fungos, 5 fungos oriundos do solo contaminado com óleo diesel, 10 oriundos do efluente de laticínios e o fungo *Aspergillus fumigatus*, disponível no Laboratório de Fermentações do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo, visto que o gênero *Aspergillus* é conhecido na literatura como um bom produtor de enzimas (CORDOVA *et al.*, 1998; SHARMA *et al.*, 2001). A Tabela 1 apresenta a identificação e gênero dos microrganismos utilizados para a

a etapa de seleção de fungos produtores de lipases com atividade de esterificação.

Tabela 1- Identificação e gênero dos microrganismos utilizados para a seleção de fungos produtores de lipases com atividade de esterificação

<b>Fungo</b>	<b>Gênero</b>
O <sub>2</sub>	Não identificado
<i>Aspergillus niger</i> (O <sub>4</sub> )	<i>Aspergillus</i>
O <sub>5</sub>	<i>Aspergillus</i>
O <sub>6</sub>	<i>Penicillium</i>
<i>Aspergillus flavus</i> (O <sub>8</sub> )	<i>Aspergillus</i>
E <sub>3</sub>	<i>Penicillium</i>
E <sub>4</sub>	Não identificado
E <sub>7</sub>	Não identificado
E <sub>9</sub>	<i>Aspergillus</i>
E <sub>10</sub>	<i>Aspergillus</i>
E <sub>12</sub>	<i>Penicillium</i>
E <sub>13</sub>	<i>Trichoderma</i>
E <sub>16</sub>	Não identificado
E <sub>18</sub>	Não identificado
<i>Aspergillus niger</i> (E <sub>19</sub> )	<i>Aspergillus</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus</i>

### **Preparo do inóculo**

O inóculo foi preparado em erlenmeyer de 1L contendo 100 mL do meio ágar-batata-dextrose (PDA) solidificado. Adicionou-se aos tubos de ensaio contendo os fungos 10 mL de solução de Tween 80 (0,1 %), fez-se a raspagem dos esporos com alça de platina e adicionou-se 2,5 mL dessa solução de esporos nos erlenmeyers contendo o meio PDA. O inóculo foi incubado durante 7 dias em estufa a 30 °C.

### **Preparo do meio de cultivo e aparato experimental**

O preparo do meio de cultivo foi realizado de acordo com Colla *et al.* (2009). O meio de cultivo utilizado para a produção de lipases foi preparado a partir da mistura de 85 % de farelo de soja e 15 % de casca de soja, a qual foi autoclavada a 121 °C por 20 min. O meio de cultivo foi adicionado em béqueres de polipropileno de 600 mL tampados com manta acrílica hidrofóbica com quantidade inicial de 25 g de meio seco. Após autoclavagem, o pH do meio foi ajustado em 4,5 através da adição de uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5 mol.L<sup>-1</sup>, e a umidade ajustada para 60 % com água destilada. Adicionou-se 2 % de óleo de soja em cada béquer como indutor para a produção de lipases, e a inoculação foi feita com a adição de 1 mL da solução de esporos (2 x 10<sup>6</sup> esporos/g de substrato seco). Essa solução de esporos foi obtida através da adição de 50 mL de Tween 80 (0,1 %) nos erlenmeyer contendo os fungos, seguido

de uma raspagem dos esporos e filtração em gaze estéril para retenção das hifas. Os experimentos foram incubados em estufa a 30 °C e a coleta das amostras para determinações analíticas foram feitas nos tempos zero e 96 horas de fermentação, sendo que para cada tempo de fermentação os ensaios foram feitos em duplicata.

### **Extração e liofilização das lipases**

A extração é uma etapa importante para a obtenção de enzimas, pois envolve o processo de ruptura celular, ou seja, as enzimas requerem um processo de ruptura celular para a sua recuperação.

O processo de extração foi realizado em erlenmeyeres de 250 mL. Nesses erlenmeyeres, contendo o meio fermentado (matriz sólida), foi adicionado tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 na razão 1:5 (10 g de meio fermentado para 50 mL de tampão) e incubados em banho a 35 °C por 20 min e agitação de 160 rpm. Após a incubação, as amostras foram filtradas, utilizando-se funil de tecido de nylon e pressão manual para a obtenção do extrato enzimático bruto (VARGAS *et al.*, 2008).

A determinação da atividade de esterificação deve ocorrer em sistema com baixo teor de umidade, assim, fez-se necessário realizar a desidratação do extrato aquoso (extrato enzimático bruto), para isso, empregou-se o processo de liofilização. A liofilização é um processo de desidratação sob baixa pressão (vácuo) e baixas temperaturas. Esta secagem ocorre através da sublimação da amostra congelada, sem ocorrer perdas de suas propriedades.

Como fase preparatória do procedimento de liofilização, os extratos enzimáticos bruto foram distribuídos em camadas de um centímetro de espessura em placas de Petri e submetidos ao congelamento a -80 °C por 24 horas (PERSSON *et al.*, 2002), logo, as placas foram 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 e vedados com Parafilm, sendo armazenadas sob refrigeração (4 °C).

### **Determinação das atividades de esterificação**

As determinações das atividades de esterificação foram realizadas no extrato enzimático bruto liofilizado (amostra seca) e os ensaios foram feitos em triplicata.

A atividade de esterificação do extrato enzimático bruto liofilizado foi quantificada através da reação de síntese do ácido oleico e etanol na razão molar de 1:1 (mistura padrão) (LANGONE *et al.*, 2002; BERNARDES *et al.*, 2007, modificado por Silva *et al.*, 2011). A reação foi conduzida em elenmeyers contendo 5 mL da mistura padrão e aproximadamente 0,1 g do extrato enzimático bruto liofilizado (enzima seca), após foram incubados em banho a 40 °C por 40 min e agitação de 160 rpm. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata e adicionadas a 20 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para paralisar a reação e para extração do ácido oleico. Após, a quantidade de ácido oleico consumido foi determinado através da titulação com NaOH 0,035 M até atingir o pH 11,0. Os ensaios dos brancos continham 20 mL da solução de acetona-etanol (1:1) e 500 µL da mistura padrão.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido graxo por minuto e calculada utilizando a Equação 1.

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

Equação 1

Onde:

AE = atividade de esterificação (U/g);

V<sub>a</sub> = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 min (mL);

V<sub>b</sub> = volume de NaOH gasto na titulação da amostra do branco (mL);

M = molaridade da solução de NaOH;

V<sub>f</sub> = volume final de meio reacional (mL);

t = tempo (min);

m = massa do extrato enzimático bruto liofilizado (g);

V<sub>c</sub> = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

### 3.2.3 Estudo de variáveis na produção de lipases pelos fungos previamente selecionados

As variáveis de estudo na produção de lipases com atividade de esterificação foram: a concentração de umidade do meio de cultivo, concentração de óleo de soja como indutor na

produção, concentração de uréia como fonte de nitrogênio e percentual de farelo de soja no meio de cultivo.

A sequência dos métodos utilizados para este estudo de variáveis na produção de lipases foram os mesmos descritos no item 3.2.2 (Preparo do inóculo, Preparo do meio de cultivo, Extração e liofilização e Determinações das atividades de esterificação). No preparo do meio de cultivo as quantidades de farelo de soja, casca de soja, umidade, óleo de soja e uréia foram adicionadas conforme os níveis estudados nos planejamentos de experimentos.

Neste estudo, utilizou-se a técnica de planejamento fatorial de experimentos com o objetivo de avaliar os efeitos das variáveis estudadas na produção de lipases com atividade de esterificação.

Esta técnica 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. Essa ferramenta também permite otimizar o sistema em estudo, com o objetivo de maximizar ou minimizar uma resposta. A principal vantagem da utilização desta ferramenta é a redução do número de experimentos e a consequente redução de custos (BARROS *et al.*, 1996).

A fim de estudar a influência da umidade, concentração de uréia, concentração de óleo de soja e do percentual de farelo de soja na composição do meio sobre a produção de lipases com atividade de esterificação via fermentação em estado sólido, foi realizado um planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  com quatro pontos centrais, totalizando 12 experimentos, ou seja, este planejamento serviu para avaliar os efeitos principais das variáveis. As variáveis e os níveis de estudo deste planejamento foram: umidade (50, 65 e 80 %), uréia (0, 1 e 2 %), óleo de soja (0, 1 e 2 %) e farelo de soja (70, 80 e 90 %). Para cada fungo selecionado (*Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>), O<sub>5</sub> (*Aspergillus* sp.), E<sub>13</sub> (*Trichoderma* sp.) e *Aspergillus fumigatus*) na primeira etapa foi conduzido um planejamento experimental.

As variáveis que se apresentaram significativas nesta etapa foram utilizadas na sequência do estudo da produção através de Planejamentos Fatoriais Completos.

Para o fungo *Aspergillus fumigatus* foi realizado um planejamento fatorial completo  $2^3$  com quatro pontos centrais, totalizando 12 experimentos. A concentração de uréia não foi utilizada como variável deste novo planejamento. As variáveis e os níveis de estudo deste planejamento foram: umidade (50, 55 e 60 %), óleo de soja (1, 2 e 3 %) e farelo de soja (60, 70 e 80 %).

Para o fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>) foi realizado dois planejamentos fatoriais completo  $2^2$ .

No primeiro planejamento fatorial completo  $2^2$  com quatro pontos centrais, totalizando 8 experimentos, as variáveis óleo de soja e farelo de soja foram fixadas em 1 % e 80 %, respectivamente, e os níveis das variáveis umidade e uréia foram deslocados. As variáveis e os níveis de estudo deste planejamento foram: umidade (50, 60 e 70 %) e uréia (0, 1 e 2 %).

No segundo planejamento fatorial completo  $2^2$  a variável uréia foi retirada, a variável umidade foi fixada em 50 %, e os níveis das variáveis óleo de soja e farelo de soja foram deslocados. As variáveis e os níveis de estudo deste planejamento foram: óleo de soja (0 e 2 %) e farelo de soja (70 e 90 %). Neste planejamento não utilizou-se pontos centrais, e sim, fez-se a réplica de experimentos, totalizando 8 experimentos.

### **Análise dos resultados das atividades de esterificação**

Os resultados de atividade de esterificação obtidos nos planejamentos foram analisados utilizando o módulo *Experimental Design* do *Software Statistica 6.0*. Os resultados foram avaliados através de análise de erro puro, sendo calculados os efeitos estimados.

#### **3.2.4 Avaliação da especificidade das lipases frente a diferentes ácidos graxos e uso das mesmas em reações de alcoólise**

A fim de tentar reproduzir os ensaios com altas atividades de esterificação obtidas nos pontos centrais do planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  dos fungos *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>) e *Aspergillus fumigatus*, realizou-se uma nova fermentação em estado sólido seguindo as condições do meio de cultivo destes ensaios, onde: umidade = 65 %, uréia = 1 %, óleo de soja = 1 % e farelo de soja = 80 %.

As condições de pH do meio de cultivo, do processo de obtenção da enzima (amostra seca) e das atividades de esterificação foram executadas conforme a Figura 3 para o *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>) e Figura 4 para o *Aspergillus fumigatus*.

Figura 3- Condições de pH do meio de cultivo, processo de obtenção da enzima e atividades de esterificação para o *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>).

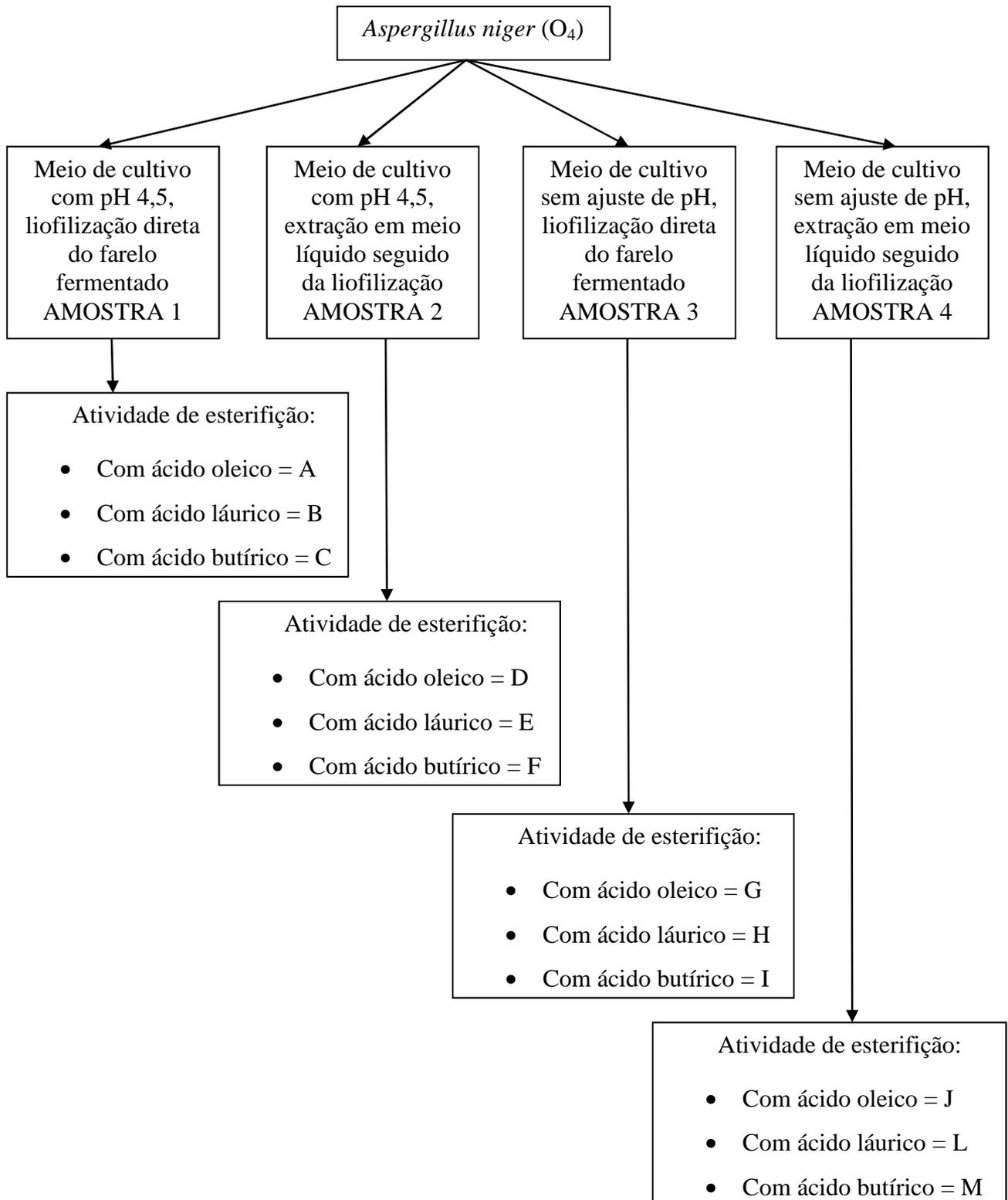
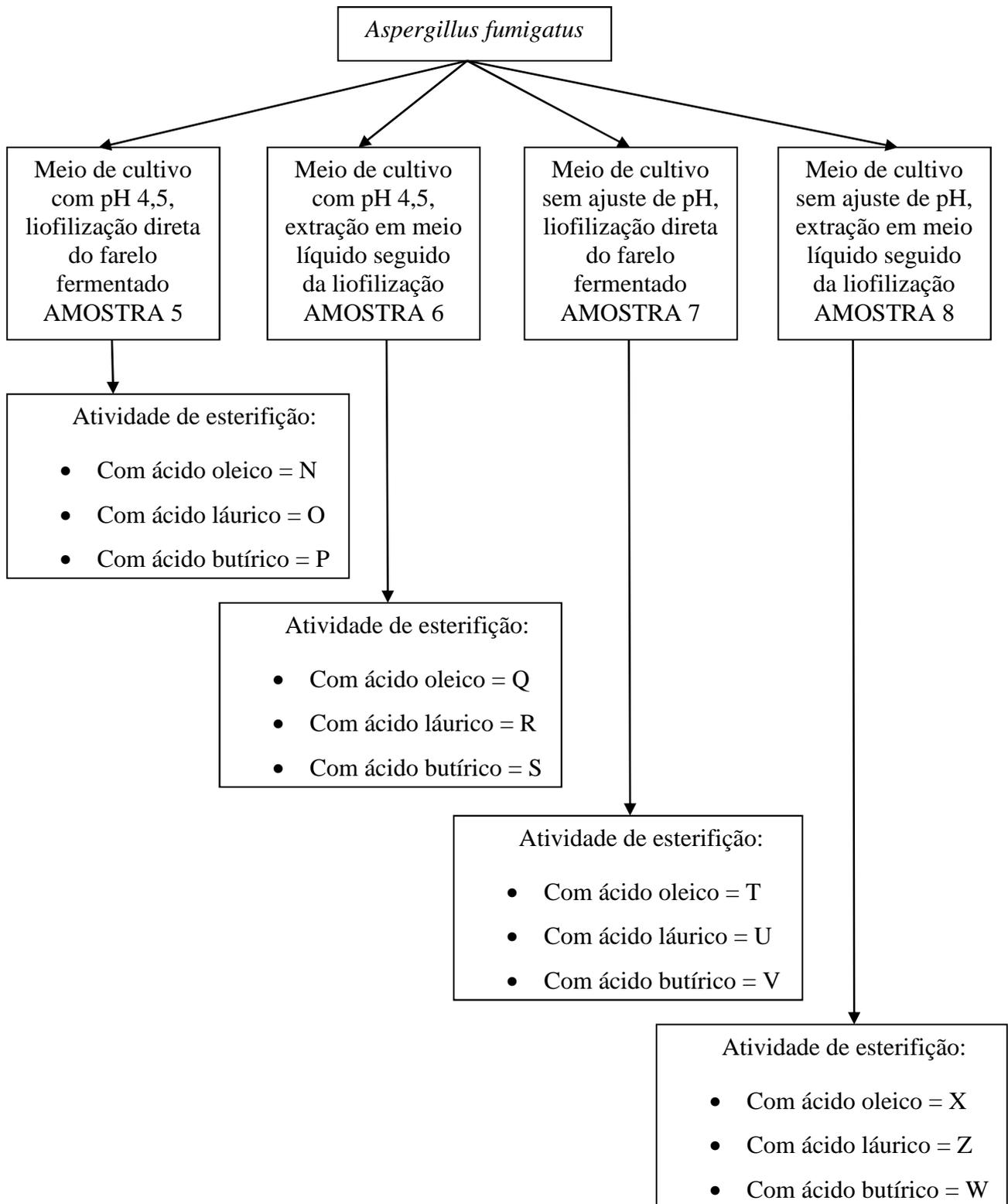


Figura 4- Condições de pH do meio de cultivo, processo de obtenção da enzima e atividades de esterificação para o *Aspergillus fumigatus*.



### **Preparo do meio de cultivo e aparato experimental**

De acordo com o conhecimento em relação aos parâmetros de condução para a produção da enzima lipase, algumas modificações no método de preparo do meio do cultivo foram realizadas.

O meio de cultivo utilizado para a produção de lipases foi preparado a partir da mistura de 80 % de farelo de soja e 20 % de casca de soja. O meio de cultivo foi adicionado em béqueres de polipropileno de 600 mL tampados com manta acrílica hidrofóbica com quantidade inicial de 25 g de meio seco. Nos ensaios com pH 4,5, o ajuste foi feito através da adição de uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ . A umidade foi ajustada para 65 % com água destilada. Para a adição dos suplementos óleo de soja (1 %) e uréia (1 %) foi preparado uma emulsão com água destilada, homogeneizando-se com mixer por 3 minutos. A emulsão foi adicionada por gotejamento manual, de forma que toda a área do meio de cultivo fosse recoberta, melhorando assim a homogeneidade do meio. O meio de cultivo foi autoclavado a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  por 20 min. Após a autoclavagem, a inoculação foi feita com a adição de 1 mL da solução de esporos. Essa solução de esporos foi obtida adicionando-se no erlenmeyer de 500 mL contendo o inóculo (descrito no item 3.2.2) 20 mL de solução aquosa de Tween 80 (0,1 % v/v) e pérolas de vidro estéreis ao para uma melhor remoção dos esporos. Para contagem dos esporos, 1 mL dessa solução de esporos era retirado assepticamente e diluído de 10 a 1000 vezes em solução aquosa estéril de Tween 80 (0,1 % v/v). A suspensão resultante foi transferida para câmara de Neubauer (Prolab) para contagem dos esporos. Para a inoculação dos fungos utilizou-se 1 mL da solução de esporos com concentração de esporos ajustada para se obter  $8,9 \times 10^8$  esporos/g de substrato seco para o fungo *Aspergillus niger* ( $O_4$ ) e  $7,2 \times 10^8$  esporos/g de substrato seco para o fungo *Aspergillus fumigatus*. Os experimentos foram incubados em câmara climatizada (Tecnal TE-410) a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  por 96 horas, com injeção de ar úmido, de forma a manter a umidade relativa do ar no interior da câmara maior que 90 %. A coleta das amostras para determinações analíticas foram feitas no tempo de 96 horas de fermentação.

Os métodos Extração e liofilização das lipases e Determinações das atividades de esterificação foram os mesmos descritos anteriormente no item 3.2.2.

### **Especificidade aos substratos de esterificação**

Conforme as Figuras 3 e 4 as especificidades da enzima liofilizada produzida pelos fungos *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>) e *Aspergillus fumigatus* foram avaliadas em relação aos ácidos graxos (substratos) para a reação de esterificação. Os ácidos utilizados foram o ácido láurico (12:0), oleico (18:1) e butírico (4:0) (BRADDOO *et al.*, 2002). O álcool utilizado para a reação foi o etanol.

### **Alcoólise de óleo vegetal utilizando lipases como catalisadores**

Com o objetivo de mostrar a utilização das lipases microbianas na produção de biodiesel, as amostras 1, 2, 3 e 4 (*Aspergillus niger*- O<sub>4</sub>) e amostras 5, 6, 7 e 8 (*Aspergillus fumigatus*) foram submetidas ao teste preliminar de aplicação da enzima liofilizada na alcoólise de óleo vegetal.

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

No procedimento experimental para reação, os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL fechados com tampa de vidro. As quantidades de óleo de soja, solvente (n- hexano) e etanol foram fixadas em 1 g, 40 mL e 150 µg, respectivamente; e a quantidade de lipase foi de 231,5 µg. Os erlenmeyers foram incubados em agitador rotativo (shaker) a 200 rpm por 8 horas. Após decorrido o tempo de reação, as amostras foram filtradas em papel filtro e levada à evaporação do solvente em estufa na temperatura de 65 °C.

Para a determinação da conversão da reação, as amostras foram previamente preparadas (após evaporação do etanol não reagido), transferindo-se 250 µL da amostra para balão volumétrico de 10 mL completando o volume com n-heptano. Após, transferiu-se uma alíquota de 50 µL desta solução para um balão volumétrico de 1 mL, a fim de obter uma concentração de 1000 mg/L e adicionou-se 50 µL de padrão interno (metil heptadecanoato) na concentração de 250 mg/L, utilizando como solvente n-heptano.

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

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

A Equação 2 apresenta a expressão utilizada para os conversões.

$$C = \frac{(\Sigma A) - A_{ei}}{A_{ei}} \times \frac{C_{ei} \times V_{ei}}{W} \times 100$$

Equação 2

Onde:

C = valor da conversão (%);

$\Sigma A$  = área total de picos entre os padrões C14 e C24:1;

$A_{ei}$  = área correspondente ao pico do padrão interno, C17:0;

$C_{ei}$  = concentração, em mg/mL, da solução de padrão interno, C17:0;

$V_{ei}$  = volume da solução de padrão interno adicionado à amostra;

W = massa da amostra (mg).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na metodologia apresentada no capítulo anterior, os resultados e suas respectivas discussões são mostrados ao longo deste capítulo.

### 4.1 TEOR DE UMIDADE DO SUBSTRATO

O teor de umidade do farelo de soja e casca de soja foram 12 % e 11 %, respectivamente.

### 4.2 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES COM ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO

Dos 5 fungos isolados do solo contaminado com óleo diesel ( O<sub>2</sub>, O<sub>4</sub>, O<sub>5</sub>, O<sub>6</sub> e O<sub>8</sub>), apenas os fungos O<sub>4</sub> (*Aspergillus niger*) e O<sub>5</sub> produziram lipases com atividade de esterificação. Já com relação aos 10 fungos isolados de efluente de indústria de laticínios (E<sub>3</sub>, E<sub>4</sub>, E<sub>7</sub>, E<sub>9</sub>, E<sub>10</sub>, E<sub>12</sub>, E<sub>13</sub>, E<sub>16</sub>, E<sub>18</sub> e E<sub>19</sub>), apenas o fungo E<sub>13</sub> produziu lipase com atividade de esterificação. A Tabela 2 apresenta as atividades de esterificação dos fungos O<sub>4</sub> (*Aspergillus niger*), O<sub>5</sub> (*Aspergillus* sp.), E<sub>13</sub> (*Trichoderma* sp.) e *Aspergillus fumigatus* em 96 horas de fermentação.

Tabela 2- Resultados da atividade de esterificação dos fungos O<sub>4</sub> (*Aspergillus niger*), O<sub>5</sub> (*Aspergillus* sp.), E<sub>13</sub> (*Trichoderma* sp.) e *Aspergillus fumigatus*

Fungo	Tempo (h)	AE (U/g) *
O <sub>4</sub> ( <i>Aspergillus niger</i> )	0	272,76 ± 0,30
O <sub>4</sub> ( <i>Aspergillus niger</i> )	96	364,58 ± 0,30
O <sub>5</sub> ( <i>Aspergillus</i> sp.)	0	363,91 ± 0,41
O <sub>5</sub> ( <i>Aspergillus</i> sp.)	96	465,01 ± 0,41
E <sub>13</sub> ( <i>Trichoderma</i> sp.)	0	0
E <sub>13</sub> ( <i>Trichoderma</i> sp.)	96	61,49 ± 1,64
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	32,38 ± 0,35
<i>Aspergillus fumigatus</i>	96	182,92 ± 0,47

\*Resultados de média±desvio padrão

Portanto, dos 16 fungos testados na etapa da triagem, apenas os fungos *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>), O<sub>5</sub> (*Aspergillus* sp.) , E<sub>13</sub> (*Trichoderma* sp.) e *Aspergillus fumigatus* produziram lipase com atividade de esterificação, os quais foram utilizados para a continuidade da pesquisa.

Colla *et al.*, (2009) estudaram a seleção de fungos filamentosos (a partir de efluente de laticínios e solo contaminado com óleo diesel) produtores de lipases com atividade hidrolítica através de fermentação em estado sólido. Os melhores produtores de lipases com atividade hidrolítica foram os fungos *Aspergillus* (E<sub>6</sub>), isolado do efluente de laticínios, com atividade lipolítica máxima de 49,81 U, e *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>), isolado do solo contaminado com óleo diesel, com máxima atividade lipolítica de 45,49 U. Ambos fungos apresentaram máximas atividades após oito dias de fermentação.

No presente estudo observou-se que o fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>) também foi o microrganismo que se apresentou como o melhor produtor de lipase com atividade de esterificação. Assim, este microrganismo foi capaz de produzir lipases com atividade de hidrólise e de esterificação por conter em sua estrutura capacidade de assimilar ambos os compostos triglicéridos e ácidos graxos, ou seja, a lipase produzida foi capaz de catalisar diferentes reações, isto pode ser atribuído às condições do meio reacional e propriedades catalíticas como especificidade.

Muitas lipases possuem a capacidade de hidrólise e síntese de ésteres, porém o meio no qual a enzima é produzida pode favorecer a atividade de esterificação devido à enantioseletividade ao substrato da reação (CHEN E SIH, 1989; TAWAKI E KLIBANOV, 1999).

Segundo Marek e Bednarski (1996), a presença de triglicéridos ou ácidos graxos de cadeia curta no meio pode aumentar a secreção de enzimas lipolíticas pelo microrganismo.

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

Pencreac'h e Baratti (2001) realizaram estudos em que compararam a atividade de 32 lipases comerciais em meio aquoso e em meio orgânico, demonstrando que não há uma relação fixa entre as atividades lipolíticas nos dois meios, ou seja, não há como prever a

atividade de uma enzima em meio orgânico baseando-se em sua atividade em meio aquoso. Estes resultados ressaltam a importância de se estudar a capacidade catalítica de lipases diretamente em meio orgânico e assim avaliar o potencial de aplicação destas enzimas em biocatálise.

### **4.3 ESTUDO DE VARIÁVEIS NA PRODUÇÃO DE LIPASE PELOS FUNGOS PREVIAMENTE SELECIONADOS**

Os fungos *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>), O<sub>5</sub> (*Aspergillus* sp.), E<sub>13</sub> (*Trichoderma* sp.) e *Aspergillus fumigatus* foram os fungos previamente selecionados na etapa de triagem como produtores de lipase com atividade de esterificação, sendo assim, estes microrganismos foram utilizados no estudo de variáveis na produção de lipases.

Inicialmente foi feito um planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  para cada fungo selecionado, onde as variáveis de estudo foram: umidade (50, 65 e 80 %), uréia (0, 1 e 2 %), óleo de soja (0, 1 e 2 %) e farelo de soja (70, 80 e 90 %). Em seguida, de acordo com as significâncias das variáveis obtidas nesse planejamento, foi necessário a realização de outros planejamentos.

#### **4.3.1 Fungo O<sub>5</sub> (*Aspergillus* sp.)**

A Tabela 3 apresenta a matriz do planejamento experimental (valores reais e codificados) com os resultados da atividade de esterificação do fungo O<sub>5</sub> (*Aspergillus* sp.) obtidos no planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ .

Tabela 3- Resultados das atividades de esterificação do fungo *O<sub>5</sub>* (*Aspergillus* sp.) obtidos no planejamento fatorial fracionário 2<sup>4-1</sup>

Ensaio	Tempo (h)	Variáveis				AE (U/g) *
		Umidade (%)	Uréia (%)	Óleo de Soja (%)	Farelo (%)	
1	0	-1 (50)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (70)	0
1	96	-1 (50)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (70)	0
2	0	+1 (80)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (90)	0
2	96	+1 (80)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (90)	0
3	0	-1 (50)	+1 (2)	-1 (0)	+1 (90)	0
3	96	-1 (50)	+1 (2)	-1 (0)	+1 (90)	0
4	0	+1 (80)	+1 (2)	-1 (0)	-1 (70)	0
4	96	+1 (80)	+1 (2)	-1 (0)	-1 (70)	43,43 ± 8,17
5	0	-1 (50)	-1 (0)	+1 (2)	+1 (90)	0
5	96	-1 (50)	-1 (0)	+1 (2)	+1 (90)	0
6	0	+1 (80)	-1 (0)	+1 (2)	-1 (70)	0
6	96	+1 (80)	-1 (0)	+1 (2)	-1 (70)	12,72 ± 7,95
7	0	-1 (50)	+1 (2)	+1 (2)	-1 (70)	0
7	96	-1 (50)	+1 (2)	+1 (2)	-1 (70)	0
8	0	+1 (80)	+1 (2)	+1 (2)	+1 (90)	0
8	96	+1 (80)	+1 (2)	+1 (2)	+1 (90)	0
9	0	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
9	96	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
10	0	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
10	96	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
11	0	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
11	96	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
12	0	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
12	96	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0

\*Resultados de média±desvio padrão

Observa-se na Tabela 3 que apenas os experimentos 4 e 6 apresentaram atividade de esterificação de 43,43 U/g e 12,72 U/g, respectivamente, no tempo de 96 horas de fermentação, sendo estas atividades consideradas muito baixas em relação à atividade obtida para este fungo na etapa de triagem (465,01 U/g) em 96 horas de fermentação. Esta queda na atividade pode ser atribuída às diferentes condições e combinações das variáveis testadas no

processo fermentativo, uma vez que na etapa de triagem o meio de cultivo era padrão, e neste planejamento as condições foram diferentes para cada ensaio, uma vez que os níveis das variáveis estudadas e as interações que as variáveis exercem umas sobre as outras podem ter ocasionado a diminuição da atividade.

Com umidade de 50 % não foi observada atividade de esterificação em nenhum dos experimentos. Com 80 % de umidade (experimentos 4 e 6) foram observadas atividades de 43,43 U/g e 12,72 U/g, respectivamente. Quando comparamos os experimentos 4 e 6, verifica-se que ambos apresentam o mesmo teor de umidade e de farelo de soja, logo, a ocorrência de atividade de esterificação somente nestes ensaios pode estar atribuída a este fato, e a maior atividade ocorrida (experimento 4) pode estar relacionada à adição da uréia como suplemento do meio, uma vez que o experimento 6 não continha uréia, mas por sua vez continha óleo de soja, logo, o óleo de soja também pode ter influenciado nos valores das atividades. Assim, o aumento da atividade de esterificação do experimento 6 para o experimento 4 pode estar relacionada com a presença de uréia e a ausência de óleo de soja; comportamento este curioso, uma vez que na etapa de triagem, na presença óleo de soja, as atividades foram muito maiores que as obtidas nesse planejamento. O mesmo comportamento acontece quando avaliamos os pontos centrais, os quais os ensaios apresentam as condições de cultivo semelhantes às condições usadas no meio fermentativo na etapa de triagem (em relação ao percentual de farelo de soja e umidade), mas por sua vez não apresentaram atividade de esterificação.

A ausência de atividade nos ensaios com 90 % de farelo de soja pode ser atribuída à possível compactação do meio, uma vez que partículas muito pequenas de substrato podem ocasionar aglomeração do meio, ou seja, menor porosidade, e como consequência ocorre a dificuldade de transferência de oxigênio.

#### **4.3.2 Fungo E<sub>13</sub> (*Trichoderma* sp.)**

A Tabela 4 apresenta a matriz do planejamento experimental (valores reais e codificados) com os resultados da atividade de esterificação do fungo E<sub>13</sub> (*Trichoderma* sp.) obtidos no planejamento fatorial fracionário 2<sup>4-1</sup>.

Tabela 4- Resultados das atividades de esterificação do fungo E<sub>13</sub> (*Trichoderma* sp.) obtidos no planejamento fatorial fracionário 2<sup>4-1</sup>

Ensaio	Tempo (h)	Variáveis				AE (U/g) *
		Umidade (%)	Uréia (%)	Óleo de Soja (%)	Farelo (%)	
1	0	-1 (50)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (70)	0
1	96	-1 (50)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (70)	0
2	0	+1 (80)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (90)	0
2	96	+1 (80)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (90)	0
3	0	-1 (50)	+1 (2)	-1 (0)	+1 (90)	0
3	96	-1 (50)	+1 (2)	-1 (0)	+1 (90)	0
4	0	+1 (80)	+1 (2)	-1 (0)	-1 (70)	0
4	96	+1 (80)	+1 (2)	-1 (0)	-1 (70)	0
5	0	-1 (50)	-1 (0)	+1 (2)	+1 (90)	0
5	96	-1 (50)	-1 (0)	+1 (2)	+1 (90)	0
6	0	+1 (80)	-1 (0)	+1 (2)	-1 (70)	21,87 ± 0
6	96	+1 (80)	-1 (0)	+1 (2)	-1 (70)	65,19 ± 17,15
7	0	-1 (50)	+1 (2)	+1 (2)	-1 (70)	25,11 ± 4,05
7	96	-1 (50)	+1 (2)	+1 (2)	-1 (70)	59,16 ± 4,16
8	0	+1 (80)	+1 (2)	+1 (2)	+1 (90)	0
8	96	+1 (80)	+1 (2)	+1 (2)	+1 (90)	35,52 ± 4,33
9	0	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
9	96	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
10	0	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
10	96	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
11	0	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
11	96	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
12	0	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
12	96	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0

\*Resultados de média±desvio padrão

Observa-se na Tabela 4 que os experimentos 6 e 7 apresentaram atividade de esterificação no tempo zero e 96 horas de fermentação, e o experimento 8 apenas no tempo de 96 horas. Os valores de atividade de esterificação variaram de 21,87 U/g (experimento 6) à 65,19 U/g (experimento 6), sendo esta a maior atividade obtida neste planejamento. Os

valores de atividade obtidos neste planejamento foram inferiores à atividade obtida para este mesmo fungo na etapa de triagem (61,49 U/g) em 96 horas de fermentação, logo, os níveis das variáveis estudados neste planejamento não foram eficientes para gerar um aumento na atividade de esterificação.

Quando a umidade foi fixada em 50 %, somente o experimento 7 apresentou atividade no tempo zero e 96 horas de fermentação, 25,11 U/g e 59,16 U/g , respectivamente. Este experimento era adicionado de 2 % de óleo de soja, 2 % de uréia e 70 % de farelo de soja.

Com a umidade fixada em 80 %, o experimento 6 apresentou atividade no tempo zero e 96 horas de fermentação, 21,87 U/g e 65,19 U/g , respectivamente. Já o experimento 8 apresentou atividade somente no tempo de 96 horas de fermentação (35,52 U/g).

A obtenção de atividade de esterificação no tempo zero e 96 horas de fermentação verificadas nos experimentos 6 e 7 pode ser atribuída ao fato destes experimentos apresentarem as mesmas condições de concentração de óleo de soja (2 %) e farelo de soja (70 %). Logo, nas mesmas condições estudadas de óleo e farelo de soja, e aumentando a umidade de 50 para 80 %, ocorreu aumento da atividade no tempo zero e 96 horas. A adição de 2 % de uréia no experimento 7 pode ter interferido nos valores de atividade, uma vez que as atividades desse experimento no tempo zero e 96 horas foram menores quando comparadas com as atividades obtidas no experimento 6 no tempo zero e 96 horas de fermentação.

Logo, o aumento da umidade, a adição de 2 % de óleo de soja e 70 % de farelo de soja podem ter causado um aumento na atividade de esterificação, tanto no tempo zero como no tempo de 96 horas de fermentação, comportamento este que pode ser visualizado nos experimentos 6 e 7.

O comportamento do fungo E<sub>13</sub> (*Trichoderma* sp.) foi semelhante ao do fungo O<sub>5</sub> (*Aspergillus* sp.) em alguns aspectos, como, a maior atividade obtida ocorreu no experimento com 80 % de umidade e 70 % de farelo de soja, e a ausência de atividade nos experimentos dos pontos centrais. Mas diferiu no fato de apresentar atividade de esterificação no experimento 7 (50 % de umidade) e no experimento 8 (90 % de farelo de soja).

Os fungos O<sub>5</sub> (*Aspergillus* sp.) e E<sub>13</sub> (*Trichoderma* sp.) foram excluídos dos posteriores planejamentos, uma vez que ambos apresentaram queda na atividade de esterificação no planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  quando comparadas com as atividades obtidas na etapa de triagem.

### 4.3.3 Fungo *Aspergillus fumigatus*

#### Planejamento Fatorial Fracionário 2<sup>4-1</sup>

A Tabela 5 apresenta a matriz do planejamento experimental (valores reais e codificados) com os resultados da atividade de esterificação do fungo *Aspergillus fumigatus* obtidos no planejamento fatorial fracionário 2<sup>4-1</sup>.

Observa-se na Tabela 5 que os experimentos 6, 7, 9, 10, 11 e 12 apresentaram atividade de esterificação no tempo de 96 horas de fermentação. Os valores de atividade de esterificação variaram de 104 U/g (experimento 6) à 587,01 U/g (experimento 7), sendo esta a maior atividade obtida neste planejamento. Os valores de atividade obtidos neste planejamento foram superiores à atividade obtida para este mesmo fungo na etapa de triagem (182,92 U/g) em 96 horas de fermentação, logo, os níveis das variáveis estudados neste planejamento foram eficientes para gerar um aumento na atividade de esterificação.

Quando a umidade foi fixada em 50 %, somente o experimento 7 apresentou atividade de esterificação (587,01 U/g). Este experimento era adicionado de 2 % de óleo de soja, 2 % de uréia e 70 % de farelo de soja. Ou seja, a maior atividade de esterificação ocorreu no experimento com os menores níveis de umidade e farelo de soja e os maiores níveis de uréia e óleo de soja. Avaliando individualmente o percentual de farelo de soja, conclui-se que quanto menor o percentual, maior a atividade de esterificação.

Com a umidade fixada em 80 %, somente o experimento 6 apresentou atividade (104 U/g). Este experimento era adicionado de 2 % de óleo de soja, 0 % de uréia e 70 % de farelo de soja.

Os experimentos 9, 10, 11 e 12 (pontos centrais) com 65 % de umidade, 1 % de uréia, 1 % de óleo de soja e 80 % de farelo de soja apresentaram atividade de esterificação no tempo de 96 horas de fermentação.

Diante dos resultados obtidos neste planejamento fica claro que a umidade e o percentual de farelo de soja apresentam grande influência na atividade de esterificação. É possível verificar que nenhum dos experimentos com 90 % de farelo de soja apresentaram atividade. Com 70 % de farelo de soja ocorreu atividade nos ensaios que apresentavam níveis extremos de umidade (experimento 6 e 7), logo, a relação destas variáveis pode influenciar nos valores das atividades, isto pode também ser levado em consideração para os pontos centrais, os quais eram compostos de uma quantidade relativamente maior de farelo de soja (80 %) e obtiveram uma diminuição da atividade quando comparada ao experimento 7 (50 %

de umidade e 70 % de farelo de soja), mas isto também pode estar relacionado com as diferentes concentrações de uréia e óleo de soja, que por sua vez, exercem influência nas atividades quando combinadas com as outras variáveis.

Tabela 5- Resultados das atividades de esterificação do fungo *Aspergillus fumigatus* obtidos no planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$

Ensaio	Tempo (h)	Variáveis				AE (U/g) *
		Umidade (%)	Uréia (%)	Óleo de Soja (%)	Farelo (%)	
1	0	-1 (50)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (70)	0
1	96	-1 (50)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (70)	0
2	0	+1 (80)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (90)	0
2	96	+1 (80)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (90)	0
3	0	-1 (50)	+1 (2)	-1 (0)	+1 (90)	0
3	96	-1 (50)	+1 (2)	-1 (0)	+1 (90)	0
4	0	+1 (80)	+1 (2)	-1 (0)	-1 (70)	0
4	96	+1 (80)	+1 (2)	-1 (0)	-1 (70)	0
5	0	-1 (50)	-1 (0)	+1 (2)	+1 (90)	0
5	96	-1 (50)	-1 (0)	+1 (2)	+1 (90)	0
6	0	+1 (80)	-1 (0)	+1 (2)	-1 (70)	0
6	96	+1 (80)	-1 (0)	+1 (2)	-1 (70)	104,00 ± 46,69
7	0	-1 (50)	+1 (2)	+1 (2)	-1 (70)	0
7	96	-1 (50)	+1 (2)	+1 (2)	-1 (70)	587,01 ± 42,04
8	0	+1 (80)	+1 (2)	+1 (2)	+1 (90)	0
8	96	+1 (80)	+1 (2)	+1 (2)	+1 (90)	0
9	0	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
9	96	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	152,62 ± 4,90
10	0	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
10	96	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	189,31 ± 84,37
11	0	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
11	96	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	106,66 ± 29,46
12	0	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
12	96	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	254,68 ± 187,82

\*Resultados de média±desvio padrão

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 (KEMPKA *et al.*, 2008; DI LUCCIO *et al.*, 2004).

Rodriguez *et al.* (2006) pesquisaram diferentes óleos como fonte de carbono para o crescimento do *Rhizopus homothallicus* e observaram que quando o óleo é adicionado ao meio de cultivo, o crescimento do microrganismo é acelerado, uma vez que a presença de triglicerídeos ou ácidos graxos podem aumentar a secreção de enzimas lipolíticas pelo microrganismo.

As máximas atividades de esterificação obtidas por Silva *et al.* (2011) ocorreram com a adição de óleo de soja ao meio de cultivo, tanto utilizando farelo de mamona quanto torta de babaçu como substrato. O mesmo foi relatado por Burkert (2003) e Maldonado *et al.* (2002), onde as melhores condições de produção de lipase foram as relativas à adição de óleo de soja.

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

De acordo com 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.

Takaç e Marul (2008) relatam que o tempo necessário para atingir a produção máxima de lipase é dependente do tipo de óleo vegetal usado como suplemento.

A Tabela 6 apresenta os efeitos estimados das variáveis sobre a atividade de esterificação nos experimentos do Planejamento Fatorial Fracionário  $2^{4-1}$ .

Tabela 6- Efeitos estimados das variáveis sobre a atividade de esterificação nos experimentos do Planejamento Fatorial Fracionário  $2^{4-1}$  para o fungo *Aspergillus fumigatus*

Fonte de variação	Efeitos estimados	Erro puro	t (3)	p
Média	116,18	18,04	6,43	< 0,05
X <sub>1</sub>	-120,75	44,21	-2,73	> 0,05
X <sub>2</sub>	120,75	44,21	2,73	> 0,05
X <sub>3</sub>	172,75	44,21	3,90	< 0,05
X <sub>4</sub>	-172,75	44,21	-3,90	< 0,05

X<sub>1</sub>: Umidade; X<sub>2</sub>: Uréia; X<sub>3</sub>: Óleo de soja; X<sub>4</sub>: Farelo de soja

A análise estatística dos resultados de atividade de esterificação permitiu a obtenção dos efeitos das variáveis estudadas.

Na Tabela 6 verifica-se que as variáveis umidade ( $X_1$ ) e farelo de soja ( $X_4$ ) apresentaram efeitos lineares negativos, e as variáveis uréia ( $X_2$ ) e óleo de soja ( $X_3$ ) apresentaram efeitos lineares positivos. O maior efeito negativo foi observado na variável farelo de soja, ou seja, quanto menor o percentual de farelo de soja, maior a atividade de esterificação; enquanto que o maior efeito positivo ocorreu na variável óleo de soja, ou seja, os maiores valores de atividade ocorreram em níveis altos de óleo de soja.

A Tabela 6 indicou significância ( $p < 0,05$ ) para as variáveis óleo de soja ( $X_3$ ) e farelo de soja ( $X_4$ ). Logo, para o nível de confiança de 95 %, as variáveis óleo de soja e farelo de soja foram significativas no processo de produção de lipases.

### **Planejamento Fatorial Completo $2^3$**

Neste planejamento as variáveis de estudo foram a umidade (50, 55 e 60 %), o óleo de soja (1, 2 e 3 %) e o percentual de farelo de soja (60, 70 e 80 %). As variáveis óleo de soja e farelo de soja foram significativas no planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  realizado anteriormente. Já a variável umidade não apresentou resultado significativo, mas devido a sua importância no processo de produção de enzimas, optou-se pela continuidade de estudo dessa variável, uma vez que a umidade é um dos fatores que mais interferem na produção das enzimas quando se utiliza fermentação em estado sólido.

A umidade dos substratos sólidos é considerada um parâmetro fundamental para a transferência de massa (água e solutos) através das células microbianas (PANDEY *et al.*, 2000).

A adição de água produz aumento de volume no substrato, o que facilita sua utilização pelos microrganismos. Entretanto, quando esta quantidade é excessiva ocorre diminuição na transferência de  $O_2$  e da produção da enzima. Por outro lado, um baixo nível de umidade reduz a difusão dos nutrientes no substrato sólido, diminuindo a hidratação e aumentando a tensão da água no substrato (BOTELLA *et al.*, 2007).

O nível de umidade adequado do substrato sólido é determinado pela natureza do material, pelo tipo de produto final desejado e pela necessidade do microrganismo. Portanto, a determinação da quantidade de líquido necessária para a manutenção da umidade do meio de cultivo é fundamental para o sucesso do processo, pois com excesso de líquido no interior da matriz sólida ocorre redução da porosidade do leito, diminuindo a difusão do oxigênio, além de propiciar um ambiente mais favorável à contaminação bacteriana e à formação de hifas aéreas. Por outro lado, baixos níveis de umidade no substrato podem prejudicar o crescimento

microbiano, uma vez que a difusão dos solutos (nutrientes) e de gás (oxigênio) será comprometida, podendo levar à falta de nutrientes e ao acúmulo de metabólitos inibitórios do crescimento (LONSANE *et al.*, 1985).

O alto conteúdo de umidade inicial na matriz sólida da fermentação mostra-se necessário, uma vez que desde o momento do inóculo até o final da fermentação, este diminuirá devido à evaporação acarretada pelo calor metabólico, ressaltando a necessidade de um balanceamento do conteúdo de água no substrato suporte da FES (CHINN *et al.*, 2008).

A Tabela 7 apresenta a matriz do planejamento experimental (valores reais e codificados) com os resultados da atividade de esterificação do fungo *Aspergillus fumigatus* obtidos no planejamento fatorial completo  $2^3$ .

Observa-se na Tabela 7 que apenas os experimentos 4 e 5 apresentaram atividade de esterificação, o experimento 5 apresentou atividade de esterificação no tempo de 96 horas de fermentação, e o experimento 4 apresentou atividade no tempo zero e 96 horas.

Os valores de atividade de esterificação variaram de 35,47 U/g (experimento 4) à 96,33 U/g (experimento 5), sendo esta a maior atividade obtida neste planejamento.

Quando a umidade foi fixada em 50 % somente o experimento 5 apresentou atividade de esterificação no tempo de 96 horas, enquanto que o experimento 4, no qual a umidade era de 60 % apresentou atividade no tempo zero e 96 horas de fermentação, ou seja, com o aumento da umidade percebeu-se um aumento da atividade nos dois tempos estudados. No experimento 5, o qual era adicionado de 1 % de óleo de soja ocorreu a maior atividade no tempo de 96 horas, assim, a menor nível de óleo estudado ocasionou maiores atividades de esterificação neste tempo de fermentação.

Quando a umidade foi fixada em 60 % e o farelo de soja em 60 % (experimento 4), ocorreu atividade nos dois tempos.

Observou-se que nesse planejamento houve uma queda nas atividades quando comparadas com as atividades obtidas no planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ .

As maiores atividades obtidas no planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  ocorreram nos ensaios com baixas umidades (50 e 65 %), mas este comportamento não ocorreu neste novo planejamento, onde, ao tentar reproduzir os ensaios com baixa umidade (50 e 60 %), as atividades foram inferiores às obtidas anteriormente, logo, devido à falta de continuidade de produção por este fungo, o mesmo foi excluído dos posteriores estudos. Os fungos são passíveis de mutações genéticas, o que pode gerar a não produção de um ensaio para outro.

Tabela 7- Resultados das atividades de esterificação do fungo *Aspergillus fumigatus* obtidos no planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>

Ensaio	Tempo (h)	Variáveis			AE (U/g) *
		Umidade (%)	Óleo de soja (%)	Farelo (%)	
1	0	-1 (50)	-1 (1)	-1 (60)	0
1	96	-1 (50)	-1 (1)	-1 (60)	0
2	0	+1 (60)	-1 (1)	-1 (60)	0
2	96	+1 (60)	-1 (1)	-1 (60)	0
3	0	-1 (50)	+1 (3)	-1 (60)	0
3	96	-1 (50)	+1 (3)	-1 (60)	0
4	0	+1 (60)	+1 (3)	-1 (60)	35,47 ± 11,82
4	96	+1 (60)	+1 (3)	-1 (60)	43,45 ± 3,97
5	0	-1 (50)	-1 (1)	+1 (80)	0
5	96	-1 (50)	-1 (1)	+1 (80)	96,33 ± 56,19
6	0	+1 (60)	-1 (1)	+1 (80)	0
6	96	+1 (60)	-1 (1)	+1 (80)	0
7	0	-1 (50)	+1 (3)	+1 (80)	0
7	96	-1 (50)	+1 (3)	+1 (80)	0
8	0	+1 (60)	+1 (3)	+1 (80)	0
8	96	+1 (60)	+1 (3)	+1 (80)	0
9	0	0 (55)	0 (2)	0 (70)	0
9	96	0 (55)	0 (2)	0 (70)	0
10	0	0 (55)	0 (2)	0 (70)	0
10	96	0 (55)	0 (2)	0 (70)	0
11	0	0 (55)	0 (2)	0 (70)	0
11	96	0 (55)	0 (2)	0 (70)	0
12	0	0 (55)	0 (2)	0 (70)	0
12	96	0 (55)	0 (2)	0 (70)	0

\*Resultados de média±desvio padrão

#### 4.3.4 Fungo *Aspergillus niger* (O4)

##### Planejamento Fatorial Fracionário 2<sup>4-1</sup>

A Tabela 8 apresenta a matriz do planejamento experimental (valores reais e codificados) com os resultados da atividade de esterificação do fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>) obtidos no planejamento fatorial fracionário 2<sup>4-1</sup>.

Observa-se na Tabela 8 que todos os experimentos apresentaram atividade de esterificação no tempo de 96 horas de fermentação, exceto o experimento 6, o qual não apresentou atividade de esterificação durante toda a fermentação. Apenas os experimentos 1 e 2 apresentaram atividade de esterificação no tempo zero e 96 horas de fermentação.

Os valores de atividade de esterificação obtidos experimentalmente variaram de 39,41 U/g (experimento 3) à 851,56 U/g (experimento 1), e as maiores atividades ocorreram nos experimentos 1 e 5 no tempo de 96 horas de fermentação, 851,56 U/g e 543,51 U/g, respectivamente, ou seja, quando a umidade foi fixada em 50 % e a uréia em 0 %.

Pode-se observar nesta tabela que mantendo-se a umidade fixa em 50 % e o óleo de soja fixo em 0% (experimentos 1), ocorreu atividade de esterificação no tempo zero e 96 horas de fermentação, comportamento semelhante ocorreu com os experimentos 5 e 7, onde a umidade foi fixada em 50 % e o óleo de soja em 2 %, os quais apresentaram atividade de esterificação no tempo de 96 horas de fermentação.

Quando a umidade foi fixada em 50 % e a uréia em 0 %, também ocorreu atividade de esterificação no tempo de 96 horas de fermentação, o que pode ser visto nos experimentos 1 e 5; o mesmo ocorreu com os experimentos 3 e 7, os quais tinham umidade de 50 % e 2 % de uréia. Assim, quando a umidade foi fixada em 50 % e aumentou-se o nível de uréia de 0 para 2 %, ocorreu um decréscimo na atividade de esterificação no tempo de 96 horas de fermentação, o que pode ser visto nos experimentos 1, 3, 5 e 7.

Quando a umidade manteve-se fixa em 50 % e o farelo de soja em 70 %, os experimentos 1 e 7 apresentaram atividade de esterificação, o mesmo ocorreu com os experimentos 3 e 5, os quais apresentavam umidade de 50 % e 90 % de farelo de soja.

Quando a umidade foi fixada em 80 % e a uréia em 2 %, os experimentos 4 e 8 apresentaram atividade de esterificação no tempo de 96 horas de fermentação, o mesmo ocorreu com experimentos 2 e 4, os quais a umidade era fixa em 80 % e o óleo de soja 0 %, observa-se também que quando aumentou-se o nível de óleo de soja de 0 para 2 % e manteve-se a umidade em 80 %, ocorreu um aumento na atividade de esterificação, isto pode ser visto

nos experimentos 2, 4 e 8. Os experimentos 2 e 8, os quais tinham 80 % de umidade e 90 % de farelo de soja, apresentaram atividade de esterificação no tempo de 96 horas de fermentação. Quando se variou o nível de farelo de soja de 70 % para 90 % ocorreu um aumento da atividade, isto pode ser visto nos experimentos 2, 4 e 8.

Já os experimentos dos pontos centrais com 65 % de umidade, 1 % de uréia, 1 % de óleo de soja e 80 % de farelo de soja apresentaram atividade de esterificação no tempo de 96 horas de fermentação, estas em torno de 200 U/g. Comportamento semelhante foi relatado por Ferraz *et al.* (2012) quando avaliaram a atividade de esterificação de lipases obtidas por *Sporobolomyces ruberrimus* via fermentação em estado sólido utilizando farelo de soja como substrato. A maior atividade de esterificação foi de 143,48 U/g obtida em 60 % de umidade e temperatura de 16 °C em 72 horas de fermentação, seguido dos ensaios com 60 % de umidade e temperatura de 30 °C, estes com atividades em torno de 130 U/g. Assim, verifica-se que em níveis intermediário de umidade é possível produzir lipases com altas atividades de esterificação.

Nota-se que o microrganismo tende a secretar maiores quantidades de enzima nos níveis intermediários de umidade e temperaturas. Isso pode estar atribuído à dificuldade de transferência de massa e calor em altos níveis de umidade. 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).

Conclui-se que as maiores atividades de esterificação foram nos experimentos 1 e 5, nos quais a umidade era de 50 % e sem a adição de uréia. Se compararmos esses dois experimentos (1 e 5) com o experimento 2, o qual também apresentou alta atividade, verifica-se ao aumentar a umidade para 80 % também foi possível obter altos valores de atividades, assim, verificou-se que a variável umidade apresenta influência no processo de produção de lipases com atividade de esterificação, logo, a significância desta variável, como mostrado na Tabela 9, justifica a importância desta no processo fermentativo.

Altas atividades de esterificação também foram verificadas nos experimentos 9, 10, 11 e 12 (pontos centrais), os quais apresentaram atividades em torno de 200 U/g. Uma vez que estes experimentos foram realizados com a adição de uréia, faz-se um contraponto com as altas atividades obtidas nos experimentos sem a adição de uréia (1, 2 e 5), assim, a variável uréia apresenta-se significativa para a obtenção de altas atividades de esterificação, o que pode ser confirmado na Tabela 9.

Tabela 8- Resultados da atividade de esterificação do fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>) obtidos no planejamento fatorial fracionário 2<sup>4-1</sup>

Ensaio	Tempo (h)	Variáveis				AE (U/g) *
		Umidade (%)	Uréia (%)	Óleo de Soja (%)	Farelo (%)	
1	0	-1 (50)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (70)	107,38 ± 16,87
1	96	-1 (50)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (70)	851,56 ± 44,19
2	0	+1 (80)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (90)	104,16 ± 29,46
2	96	+1 (80)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (90)	126,75 ± 5,78
3	0	-1 (50)	+1 (2)	-1 (0)	+1 (90)	0
3	96	-1 (50)	+1 (2)	-1 (0)	+1 (90)	39,41 ± 44,59
4	0	+1 (80)	+1 (2)	-1 (0)	-1 (70)	0
4	96	+1 (80)	+1 (2)	-1 (0)	-1 (70)	53,97 ± 46,25
5	0	-1 (50)	-1 (0)	+1 (2)	+1 (90)	0
5	96	-1 (50)	-1 (0)	+1 (2)	+1 (90)	543,51 ± 35,69
6	0	+1 (80)	-1 (0)	+1 (2)	-1 (70)	0
6	96	+1 (80)	-1 (0)	+1 (2)	-1 (70)	0
7	0	-1 (50)	+1 (2)	+1 (2)	-1 (70)	0
7	96	-1 (50)	+1 (2)	+1 (2)	-1 (70)	51,51 ± 11,56
8	0	+1 (80)	+1 (2)	+1 (2)	+1 (90)	0
8	96	+1 (80)	+1 (2)	+1 (2)	+1 (90)	235,83 ± 23,57
9	0	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
9	96	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	231,37 ± 17,84
10	0	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
10	96	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	233,33 ± 23,57
11	0	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
11	96	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	225,12 ± 30,03
12	0	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	0
12	96	0 (65)	0 (1)	0 (1)	0 (80)	206,13 ± 17,84

\*Resultados de média±desvio padrão

A Tabela 9 apresenta os efeitos estimados das variáveis sobre a atividade de esterificação nos experimentos do Planejamento Fatorial Fracionário  $2^{4-1}$ .

Tabela 9- Efeitos estimados das variáveis sobre a atividade de esterificação nos experimentos do Planejamento Fatorial Fracionário  $2^{4-1}$  para o fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>)

Fonte de variação	Efeitos estimados	Erro puro	t (3)	p
Média	215,58	3,58	60,17	< 0,05
X <sub>1</sub>	-266,55	8,77	-30,37	< 0,05
X <sub>2</sub>	-232,38	8,77	-26,48	< 0,05
X <sub>3</sub>	-7,32	8,77	-0,83	> 0,05
X <sub>4</sub>	-2,08	8,77	-0,23	> 0,05

X<sub>1</sub>: Umidade; X<sub>2</sub>: Uréia; X<sub>3</sub>: Óleo de soja; X<sub>4</sub>: Farelo de soja

A partir da Tabela 9 verifica-se que todas as variáveis apresentaram efeitos lineares negativos, ou seja, variando-se do nível superior para o nível inferior das variáveis, a atividade de esterificação aumenta. Os maiores efeitos observados sobre a atividade de esterificação foram das variáveis umidade e uréia, ou seja, os maiores valores de atividade ocorreram em níveis baixos destas. Embora as variáveis óleo de soja e farelo de soja apresentaram efeito negativo, estas não foram significativas.

A Tabela 9 indicou significância ( $p < 0,05$ ) para as variáveis umidade (X<sub>1</sub>) e uréia (X<sub>2</sub>). Logo, para o nível de confiança de 95 %, as variáveis umidade e uréia foram significativas no processo.

Após o conhecimento das variáveis que apresentaram-se significativas na produção de lipase com atividade de esterificação através do fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>) no planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ , fez-se necessário a realização de um planejamento fatorial completo  $2^2$ , com o objetivo de seguir estudando a influência das variáveis que foram significativas no processo de produção de lipase com atividade de esterificação.

### **Planejamento Fatorial Completo $2^2$**

Neste planejamento as variáveis de estudo foram a umidade (50, 60 e 70 %) e a concentração de uréia (0, 1 e 2 %), uma vez que estas variáveis mostraram-se significativas no planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  realizado anteriormente, assim, estas duas variáveis foram objeto de estudo para esse novo planejamento realizado para o fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>). Neste planejamento as variáveis óleo de soja e percentual de farelo de soja foram fixados em 1 e 80 %, respectivamente, e deslocou-se os níveis estudados de umidade e uréia.

A Tabela 10 apresenta a matriz do planejamento experimental (valores reais e codificados) com os resultados da atividade de esterificação do fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>) obtidos no primeiro planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>.

Tabela 10- Resultados das atividades de esterificação do fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>) obtidos no primeiro planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>

Ensaio	Tempo (h)	Variáveis		AE (U/g) *
		Umidade (%)	Uréia (%)	
1	0	-1 (50)	-1 (0)	0
1	96	-1 (50)	-1 (0)	0
2	0	+1 (70)	-1 (0)	47,57 ± 25,48
2	96	+1 (70)	-1 (0)	112,15 ± 11,93
3	0	-1 (50)	+1 (2)	0
3	96	-1 (50)	+1 (2)	0
4	0	+1 (70)	+1 (2)	46,22 ± 16,50
4	96	+1 (70)	+1 (2)	121,21 ± 4,01
5	0	0 (60)	0 (1)	0
5	96	0 (60)	0 (1)	66,40 ± 3,90
6	0	0 (60)	0 (1)	0
6	96	0 (60)	0 (1)	51,23 ± 11,82
7	0	0 (60)	0 (1)	0
7	96	0 (60)	0 (1)	24,76 ± 0
8	0	0 (60)	0 (1)	0
8	96	0 (60)	0 (1)	31,81 ± 7,95

\*Resultados de média±desvio padrão

Observa-se na Tabela 10 que os experimentos 2 e 4 apresentaram atividade de esterificação no tempo zero e 96 horas de fermentação, enquanto que os experimentos do ponto central (5, 6, 7 e 8) apresentaram atividade somente no tempo de 96 horas de fermentação. Os valores de atividade obtidos neste novo planejamento para o fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>) foram inferiores às atividades obtidas no planejamento fatorial fracionário 2<sup>4-1</sup>. Assim, os níveis das variáveis estudados neste planejamento não foram eficientes para gerar um aumento na atividade de esterificação.

Os valores de atividade de esterificação variaram de 24,76 U/g (experimento 7) à 121,21 U/g (experimento 4), sendo esta a maior atividade obtida neste planejamento.

Os experimentos (1 e 3) em que a umidade era fixa em 50 % não apresentaram atividade de esterificação em nenhum dos tempos estudados, enquanto que os experimentos (2 e 4), os quais a umidade era de 70 % apresentaram atividade no tempo zero e 96 horas de fermentação, estes dois experimentos diferem-se apenas na adição de uréia, assim, verifica-se que o experimento 4, o qual era adicionado de uréia foi o que apresentou a maior atividade de esterificação, logo, níveis altos de uréia oferecem altas atividades, neste caso, quando a umidade foi fixada em 70 %.

Já os experimentos do ponto central, em que a umidade era fixa em 60 % e a uréia fixa em 1 % apresentaram atividade somente no tempo de 96 horas. Estas atividades foram consideradas baixas quando comparadas com as dos outros experimentos no tempo de 96h, isto pode ser atribuído ao decréscimo da umidade, uma vez que não ocorreu atividade nos experimentos em que a umidade foi fixada em 50 %, logo, conclui-se que para esse planejamento o maior nível de umidade estudado foi o melhor (70 %). Comportamento semelhante ocorreu em estudo feito por Di Luccio *et al.* (2004), que indicaram a necessidade de 70 % de umidade em suporte inerte em farelo de soja para a produção de lipases por FES.

A Tabela 11 apresenta os resultados da análise de variância para as atividades de esterificação no tempo de 96 horas obtidas pelo fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>) no Planejamento Fatorial Completo 2<sup>2</sup>.

Tabela 11- Análise de variância para as atividades de esterificação no tempo de 96h obtidas pelo fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>) no Planejamento Fatorial Completo 2<sup>2</sup>

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Fcalculado
Regressão	4924,43	3	1641,47	5,37
Resíduo	1222,16	4	305,54	
Falta de ajuste	150,09	1		
Erro puro	1072,06	3		
Total	6146,60	7		

$F_{\text{tab},3,4, 95\%} = 6,59$

$R^2 = 0,80114$

Como Fcalculado é menor que o Ftabelado ( $5,37 < 6,59$ ) não há validação do modelo pela análise de variância (ANOVA), logo, não foi possível construir a superfície de resposta.

A Tabela 12 apresenta os efeitos estimados das variáveis sobre a atividade de esterificação nos experimentos do Planejamento Fatorial Completo 2<sup>2</sup>.

Tabela 12- Efeitos estimados das variáveis sobre a atividade de esterificação nos experimentos do Planejamento Fatorial Completo  $2^2$  para o fungo *Aspergillus niger* ( $O_4$ )

Fonte de variação	Efeitos estimados	Erro puro	t (3)	p
Média	39,22	6,68	5,86	< 0,05
X <sub>1</sub>	69,78	18,90	3,69	< 0,05
X <sub>2</sub>	5,20	18,90	0,27	> 0,50
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	5,20	18,90	0,27	> 0,50

X<sub>1</sub>: Umidade; X<sub>2</sub>: Uréia

A Tabela 12 indicou significância ( $p < 0,05$ ) apenas para a variável umidade ( $p < 0,03$ ).

A partir desta tabela verifica-se que ambas as variáveis apresentaram efeitos lineares positivos, ou seja, variando-se do nível inferior para o nível superior da variável, a atividade de esterificação aumenta. O maior efeito observado sobre a atividade de esterificação foi o da umidade (69,78), ou seja, a atividade aumenta de 69,78 U variando-se a umidade de 50 % para 70 %, logo, os maiores valores de atividade ocorreram no maior nível de umidade estudado. Embora o efeito da uréia tenha sido positivo, este não foi significativo.

Como as atividades obtidas nesse planejamento foram inferiores aos valores das atividades obtidas no planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  fez-se necessário a realização de um novo planejamento  $2^2$  a fim de tentar recuperar as altas atividades obtidas no planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ , e para isso, fixou-se a umidade e a uréia em 50 % e 0 %, respectivamente (condições dos ensaios em que ocorreram as maiores atividades) e variou-se os níveis de óleo de soja e farelo de soja.

A Tabela 13 apresenta a matriz do planejamento experimental (valores reais e codificados) com os resultados da atividade de esterificação do fungo *Aspergillus niger* ( $O_4$ ) obtidos no segundo planejamento fatorial completo  $2^2$ .

Observa-se na Tabela 13 que os experimentos 1, 3, 4, 5, 7 e 8 apresentaram atividade de esterificação no tempo de 96 horas de fermentação, enquanto que os experimentos 2 e 6 não apresentaram atividade em nenhum dos tempos.

Os valores de atividade de esterificação variaram de 19 U/g (experimentos 3 e 7) à 23 U/g (experimentos 1, 4, 5 e 8).

Verifica-se também que os ensaios com 70 % de farelo de soja somente apresentaram atividade na ausência de óleo de soja, já os experimentos com 90 % de farelo de soja apresentaram atividades na presença e ausência de óleo de soja.

Os experimentos 1 e 5, os quais seguem as mesmas condições de umidade, uréia, óleo de soja e farelo de soja apresentaram atividades em torno de 23 U/g, sendo esta atividade

muito inferior as obtidas nessas mesmas condições no planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  (experimento 1), logo, não foi possível recuperar as altas atividades.

Tabela 13- Resultados das atividades de esterificação do fungo *O<sub>4</sub> Aspergillus niger* (*O<sub>4</sub>*) obtidos no segundo planejamento fatorial completo  $2^2$

Ensaio	Tempo (h)	Variáveis		AE (U/g) *
		Óleo de soja (%)	Farelo de soja (%)	
1	0	-1 (0)	-1 (70)	0
1	96	-1 (0)	-1 (70)	23,18 ± 3,73
2	0	+1 (2)	-1 (70)	0
2	96	+1 (2)	-1 (70)	0
3	0	-1 (0)	+1 (90)	0
3	96	-1 (0)	+1 (90)	19,11 ± 7,35
4	0	+1 (2)	+1 (90)	0
4	96	+1 (2)	+1 (90)	23,18 ± 3,73
5	0	-1 (0)	-1 (70)	0
5	96	-1 (0)	-1 (70)	23,78 ± 4,24
6	0	+1 (2)	-1 (70)	0
6	96	+1 (2)	-1 (70)	0
7	0	-1 (0)	+1 (90)	0
7	96	-1 (0)	+1 (90)	19,53 ± 0
8	0	+1 (2)	+1 (90)	0
8	96	+1 (2)	+1 (90)	23,55 ± 4,20

\*Resultados de média ± desvio padrão

Já que a reprodução dos experimentos 1 e 5 no planejamento fatorial completo  $2^2$  do fungo *Aspergillus niger* (*O<sub>4</sub>*) não foi possível, surgiu a alternativa de tentar recuperar então as atividades obtidas nos pontos centrais do planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  tanto para o fungo *Aspergillus niger* (*O<sub>4</sub>*) como para o fungo *Aspergillus fumigatus*.

A perda da capacidade do fungo na produção de lipases pode estar relacionada à depleção dos meios de manutenção durante o armazenamento. Ainda, pode haver o acúmulo de certos metabólitos, os quais diminuem a produtividade da cultura. A perda de capacidade do fungo durante os períodos de manutenção pode ser resolvida através da utilização de meios de reativação, contendo como única fonte de carbono assimilável os óleos vegetais (MAKHSUMKHANOV *et al.*, 2003).

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DAS LIPASES FRENTE A DIFERENTES ÁCIDOS GRAXOS E USO DAS MESMAS EM REAÇÕES DE ALCOÓLISE

As taxas de reações de síntese e o método de dosagem de atividade são controlados por diferentes variáveis, tais como, a fonte e atividade catalítica da enzima, o tipo de reação, o substrato, e o solvente usado, bem como a temperatura (Ruiz *et al.*, 2008). Baseando-se nisso, o presente trabalho realizou a avaliação do efeito de diferentes ácidos na atividade catalítica da lipase produzida através de fermentação em estado sólido, uma vez que altos rendimentos nas reações de esterificação começam pela escolha do meio da reação.

A Tabela 14 apresenta a atividade de esterificação do fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>).

Tabela 14- Resultados das atividades de esterificação do fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>).

Amostra	Identificação	Tempo (h)	AE (U/g) *
1	A	96	185,52 ± 56,09
1	B	96	0
1	C	96	125,47 ± 16,73
2	D	96	119,39 ± 59,69
2	E	96	0
2	F	96	112,73 ± 51,05
3	G	96	451,50 ± 0
3	H	96	0
3	I	96	661,43 ± 15,93
4	J	96	450,59 ± 17,46
4	L	96	0
4	M	96	514,19 ± 52,29

\*Resultados de média ± desvio padrão

Amostra 1 = meio de cultivo com pH 4,5, liofilização com o meio (PES)

Amostra 2 = meio de cultivo com pH4,5, extração e liofilização

Amostra 3 = meio de cultivo sem ajuste de pH, liofilização com o meio (PES)

Amostra 4 = meio de cultivo sem ajuste de pH, extração e liofilização

Identificação A, D, G e J = com ácido oleico

Identificação B, E, H e L = com ácido láurico

Identificação C, F, I e M = com ácido butírico

A partir da Tabela 14 observa-se que todas as amostras apresentaram atividade de esterificação em 96 horas de fermentação com ácido oleico (A, D, G e J) e com ácido butírico (C, F, I e M), enquanto que com ácido láurico nenhuma das amostras apresentou atividade. Dessa forma, verifica-se que as amostras apresentaram afinidade por ácidos de cadeia curta

(C4:0) e cadeia longa (C18:1) em presença de etanol, enquanto que com o ácido de cadeia média (C12:0) não ocorreu afinidade por nenhuma das amostras.

A amostra 1, em que o meio de cultivo era com pH 4,5 e feito a liofilização com meio (PES) apresentou maior atividade de esterificação com o ácido oleico (A), o mesmo ocorreu com a amostra 2 (D) em que o pH também era de 4,5 mas feito a extração e liofilização das enzimas, logo, as enzimas produzidas nestas condições de pH apresentaram maiores afinidades pelo ácido oleico, ou seja, ácidos de cadeia longa (C18:1). No entanto, a enzima apresentou bons resultados quando sua atividade foi medida em meio contendo ácido butírico, pois também apresentaram altas atividades (C e F), estas em torno de 100 U/g. As maiores atividades obtidas em reações contendo ácido oleico pode ser atribuída ao fato de o meio de cultivo ser suplementado com óleo de soja, uma vez que este triglicerídeo apresenta em sua estrutura a maioria de cadeias C18:2.

A amostra 3, em que o pH do meio não foi ajustado e feito a liofilização com o meio (PES) apresentou maior atividade de esterificação com o ácido butírico (I), o mesmo ocorreu com a amostra 4 (M) em que o pH do meio também não foi ajustado mas feito a extração e liofilização das enzimas, logo, as enzimas produzidas em meio de cultivo sem ajuste de pH apresentaram maiores afinidades pelo ácido butírico, ou seja, ácidos de cadeia curta (C4:0). No entanto, a enzima apresenta bons resultados quando sua atividade é medida em meio contendo ácido oleico, pois também apresentaram altas atividades (G e J), estas em torno de 450 U/g; logo, isso pode ter ocorrido devido a suplementação do meio com óleo de soja.

Assim, o meio de cultivo sem ajuste de pH foi a melhor condição para a reação de esterificação, uma vez que as maiores atividades de esterificação obtidas das lipases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>) aconteceram nestes ensaios (amostras 3 e 4), tanto com o ácido oleico como com o ácido butírico, assim percebe-se que as etapas de liofilização com o meio (PES) e a extração e liofilização das enzimas não apresentaram muita influência sobre as atividades, já que estas foram altas. As maiores atividades aconteceram na amostra 3 tanto com ácido oleico como com o ácido butírico, ou seja, nas condições em que o pH do meio não foi ajustado e feito a liofilização com o meio (PES), uma vez que essa semi imobilização pode conferir uma certa proteção à estrutura da enzima.

Comportamento semelhante foi relatado por Silva *et al.* (2011), onde observaram que lipases obtidas de *Penicillium brevicompactum* em torta de babaçu, a qual apresenta em sua composição ácidos graxos de cadeia média C12:0 (55 %), mostrou maior afinidade quando o meio no qual está interagindo é de cadeia longa (C18:1) em presença de etanol, o mesmo ocorreu utilizando o farelo de mamona, onde, as maiores atividades ocorreram na presença de

álcool de cadeia curta (etanol). Em reações com ácido butírico e com ácido láurico, utilizando o farelo de mamona como substrato, as lipases também apresentaram maior especificidade por alcoóis de cadeia curta (etanol).

Comportamento similar foi relatado por Ferraz *et al.* (2010), onde o emprego do ácido butírico resultou nas maiores atividades lipásicas, com um pico de atividade de 446,50 U/g para a enzima produzida por *Penicillium crustosum* utilizando farelo de soja como substrato, reagindo com metanol como álcool. Essa mesma enzima apresentou a segunda maior atividade lipásica de 362,16 U/g quando da utilização do ácido butírico reagindo com etanol como álcool. Com o ácido láurico, a enzima produzida em meio contendo farelo de soja apresentou atividade de esterificação de 8,72 e 14,95 U/g, quando empregado metanol e etanol, respectivamente. Esse fato pode ser devido à maior especificidade das enzimas avaliadas para ácidos graxos de cadeia longa insaturados, como o ácido oleico, e não saturados, como o ácido láurico.

Comportamento semelhante foi observado por Smaniotto (2010), na produção de lipases sintéticas por fermentação submersa (FS), em meio utilizando *Sporobolomyces ruberrimus*. As enzimas apresentaram maior especificidade em relação ao ácido graxo de cadeia curta e ao álcool de menor cadeia carbônica. O emprego do ácido butírico resultou na maior atividade lipásica de 404,3 U/g<sub>extrato liofilizado</sub> para o extrato enzimático bruto com metanol.

A especificidade da lipase imobilizada de *Mucor* sp. em relação a ácidos graxos de cadeia curta (ácidos propiônico, butírico e capróico) foi avaliada por Abbas e Comeau (2003). Todos os ácidos graxos foram capazes de realizar a reação de esterificação empregando diversos alcoóis. Contudo, as maiores taxas e rendimentos reacionais foram observados para o ácido com maior número de carbono (capróico).

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), podendo-se citar os trabalhos desenvolvidos por Sun e Xu (2009) e Wang *et al.* (2008).

Existem poucas referências na literatura em relação à afinidade de lipases microbianas não-comerciais por substratos de cadeia curta, já que essas moléculas podem exercer efeitos inibitórios sobre a enzima (ABBAS e COMEAU, 2003; OZYILMAZ e GEZER, 2010).

Rúa e Ballesteros (1994) ressaltam que a diferença de atividade obtida por uma mesma lipase em meios reacionais diferentes pode estar relacionada com o número de moléculas da enzima presente no meio reacional. Assim, fica claro que a reação de esterificação é dependente diretamente da concentração das lipases presentes em cada extrato.

Conseqüentemente, a presença de isoenzimas contidas naturalmente em biocatalisadores brutos, enzimas hidrolíticas e misturas complexas de isoenzimas podem estar presentes em algumas lipases adquiridas comercialmente (MARIA *et al.*, 2002; MARIA e SINISTERRA, 1999). Bertolini *et al.* (1995) descrevem que em sua estrutura a lipase pode possuir mecanismos capazes de promover sua adaptação em diferentes ambientes reacionais com diferentes tipos de substratos, conseguindo assim atividade em diferentes meios reacionais.

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) (JENSEN, 1983).

A Tabela 15 apresenta a atividade de esterificação do fungo *Aspergillus fumigatus*, e a partir desta observa-se que todas as amostras apresentaram atividade de esterificação em 96 horas de fermentação com ácido oleico (N, Q, T e X); com o ácido butírico somente a amostra 7 (V) apresentou atividade, enquanto que com ácido láurico nenhuma das amostras apresentaram atividade, ou seja, as amostras apresentaram maiores afinidades por ácido de cadeia longa (C18:1) em presença de etanol.

A maior atividade com o ácido oleico aconteceu na amostra 5 (395,43 U/g), na qual o meio de cultivo era com pH 4,5 e feito a liofilização com o meio (PES), seguido das amostras 6, 7 e 8, as quais apresentaram atividades em torno de 375 U/g. Assim, verifica-se que as condições de pH, extração e liofilização das enzimas e liofilização com o meio (PES) não influenciaram a especificidade da enzima produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* em relação ao ácido oleico, já que todas as amostras apresentaram altas atividades com esse ácido.

No meio de cultivo com pH 4,5 (amostras 5 e 6), a maior atividade com o ácido oleico ocorreu na amostra em que fez-se a liofilização com o meio, logo, esta etapa pode ter contribuído para a obtenção da maior atividade nessa condição de pH. Já em relação as amostras em que não fez-se o ajuste do pH do meio (amostras 7 e 8), as atividades com o ácido oleico foram praticamente a mesma, logo, as condições destes ensaios não afetaram nas atividades em relação a este ácido.

Em relação a amostra 7, em que o pH do meio não foi ajustado e feito a liofilização com o meio (PES), a maior atividade ocorreu com o ácido butírico (410,75 U/g), logo, a enzima produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* nestas condições apresentou maior afinidade pelo ácido butírico (C4:0), uma vez que a atividade obtida foi maior que a obtida com o ácido oleico nesta mesma amostra. No entanto, a enzima também apresentou afinidade pelo ácido oleico, pois também apresentou alta atividade. Comportamento semelhante

aconteceu com o fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>), o qual também apresentou maiores atividades na amostra em que o pH do meio não foi ajustado e feito a liofilização com o meio (PES), logo, essa semi imobilização pode ter exercido uma certa proteção a enzima.

Tabela 15- Resultados das atividades de esterificação do fungo *Aspergillus fumigatus*.

Amostra	Identificação	Tempo (h)	AE (U/g) *
5	N	96	395,43 ± 8,41
5	O	96	0
5	P	96	0
6	Q	96	375,48 ± 12,65
6	R	96	0
6	S	96	0
7	T	96	374,54 ± 0
7	U	96	0
7	V	96	410,75 ± 25,88
8	X	96	374,88 ± 7,97
8	Z	96	0
8	W	96	0

\*Resultados de média ± desvio padrão

Amostra 5 = meio de cultivo com pH 4,5, liofilização com o meio (PES)

Amostra 6 = meio de cultivo com pH4,5, extração e liofilização

Amostra 7 = meio de cultivo sem ajuste de pH, liofilização com o meio (PES)

Amostra 8 = meio de cultivo sem ajuste de pH, extração e liofilização

Identificação N, Q, T e X = com ácido oleico

Identificação O, R, U e Z = com ácido láurico

Identificação P, S, V e W = com ácido butírico

Já que todas as amostras (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8) apresentaram resultados de atividade de esterificação, estas foram submetidas ao teste preliminar de aplicação da enzima na alcoólise de óleo vegetal.

A Tabela 16 apresenta as conversões obtidas na alcoólise enzimática do óleo de soja em solvente orgânico do fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>) e *Aspergillus fumigatus*.

Tabela 16- Conversões obtidas na alcoólise enzimática do óleo de soja em solvente orgânico do fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>) e *Aspergillus fumigatus*.

Amostra	Microrganismo	Conversão (%)*
1	<i>Aspergillus niger</i>	1,76 ± 0,19
2	<i>Aspergillus niger</i>	5,32 ± 0,55
3	<i>Aspergillus niger</i>	0,75 ± 0,11
4	<i>Aspergillus niger</i>	2,04 ± 0,21
5	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,55 ± 0,40
6	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,28 ± 0,31
7	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,19 ± 0,28
8	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,57 ± 0,14

\*Resultados de média ± desvio padrão

Amostra 1 e 5 = meio de cultivo com pH 4,5, liofilização com o meio (PES)

Amostra 2 e 6 = meio de cultivo com pH 4,5, extração e liofilização

Amostra 3 e 7 = meio de cultivo sem ajuste de pH, liofilização com o meio (PES)

Amostra 4 e 8 = meio de cultivo sem ajuste de pH, extração e liofilização

Observa-se na Tabela 16 que todas as amostras apresentaram conversão.

Avaliando as conversões obtidas nas amostras do fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>) verifica-se que a maior conversão ocorreu na amostra 2 (5,32 %), na qual o pH do meio foi ajustado em 4,5 e feito a extração e liofilização das enzimas, seguido da amostra 4 (2,04 %), na qual o meio de cultivo era sem ajuste de pH e feito a extração e liofilização das enzimas, logo, o ajuste de pH pode ter influência sobre as conversões já que as etapas de extração e liofilização foram feitas em ambas as amostras. O mesmo comportamento ocorreu com as amostras 1 e 3, as quais foram liofilizadas com o meio de cultivo, onde a maior conversão ocorreu na amostra com meio de cultivo com pH 4,5 (1,76 %).

Observando as etapas de extração e liofilização das enzimas e a etapa de liofilização com o meio de cultivo verifica-se que as maiores conversões aconteceram nas amostras em que foram feitas a extração e liofilização das enzimas (amostras 2 e 4), logo, estas etapas mostraram-se mais eficiente para gerar maiores conversões.

Dessa forma, a lipase produzida pelo fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>) que apresentou maior conversão foi nas condições de meio de cultivo com pH 4,5 seguido da extração e liofilização da enzima.

Já para o fungo *Aspergillus fumigatus* verifica-se que a maior conversão ocorreu na amostra 5 (2,55 %), na qual o pH do meio foi ajustado em 4,5 e feita a liofilização com o meio de cultivo, seguido da amostra 6 (2,28 %) que também apresentava pH do meio de 4,5 mas com a etapa de extração e liofilização das enzimas. Quando foi feito a extração e liofilização das enzimas (amostras 6 e 8) a maior conversão ocorreu na amostra 6, na qual o

pH do meio foi ajustado em 4,5. Quando foi feito a liofilização com o meio de cultivo (amostras 5 e 7) a maior conversão ocorreu na amostra 5, a qual o pH do meio também era ajustado em 4,5, logo, o ajuste do pH do meio em 4,5 mostrou-se eficiente para gerar maiores conversões, já que quando o meio de cultivo era sem ajuste de pH aconteceu as menores conversões.

Dessa forma, a lipase produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* que apresentou maior conversão foi nas condições de meio de cultivo com pH 4,5 seguido da liofilização com meio.

Assim, verifica-se que ajustando o pH do meio em 4,5 as conversões foram maiores, tanto para o fungo *Aspergillus niger* (O<sub>4</sub>) como para o fungo *Aspergillus fumigatus*.

As baixas conversões obtidas para ambos os microrganismos pode ser atribuída a utilização de uma condição previamente otimizada por Faccio (2004), uma vez que estas condições foram otimizadas para uma enzima comercial (Novozym 435). Melhores resultados podem ser obtidos fazendo-se ajustes nesta metodologia, como, aumentar a quantidade de enzima, tipo de triglicerídeo, tempo de reação e solvente.

Faccio (2004) realizou estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais. Para o sistema óleo de soja –Lipozyme UM, a maior conversão (95,6 %) foi obtida na condição de menor temperatura (35 °C), razão molar óleo:etanol (1:3), maior concentração da enzima (20 % p/p) e concentração de água de 10 % p/p. Já para o sistema óleo de soja- Novozym 435 a a maior conversão (11,8 %) foi obtida na condição de maior temperatura (65 °C), maior razão molar óleo:etanol (1:10), menor concentração da enzima (5 % p/p) e menor concentração de água (0 % p/p).

A razão molar óleo:álcool é uma das variáveis mais importantes que afetam o rendimento de ésteres de ácidos graxos. Kusdiana e Saka (2001) 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.

As maiores conversões obtidas por Silva *et al.* (2011) foram de 15, 6 % para uma enzima precipitada obtida a partir da torta de babaçu por *Penicillium brevicompactum*, seguido de uma conversão de 6,5 % também para uma enzima precipitada a partir de farelo de mamona por *Penicillium brevicompactum*. Toda-via, a etapa de precipitação pode ter influenciado em uma maior conversão, já que este método pode aglomerar somente enzimas com maior poder catalítico, ou seja, as enzimas estão com ausência de possíveis interferentes que se liguem ao sítio ativo da enzima, fazendo com que a reação não ocorra, cabe ressaltar que as enzimas foram imobilizadas em alginato de sódio e carvão ativado.

Dessa forma, para ocorrer um aumento nas conversões das enzimas utilizadas neste trabalho, podem-se empregar métodos como precipitação ou imobilização, as quais podem preservar o poder catalítico da enzima. Diferentes sistemas reacionais também podem ser testados visando o aumento da conversão do processo.

A técnica de precipitação das proteínas com sais é considerada uma ferramenta importante para a concentração de proteínas. Esse processo de concentração promove a separação das proteínas da maioria dos demais compostos do meio, facilitando os processos subsequentes (MARTINS, 2001).

Zenevicz (2011) produziu ésteres etílicos em solvente orgânico utilizando as lipases produzidas por fermentação em estado sólido de *Penicillium brevicompactum* obtidas nas condições descritas por Silva *et al.* (2011). As conversões foram avaliadas para diferentes formas de obtenção (torta fermentada (PES) seco em estufa, torta fermentada (PES) liofilizado, extrato precipitado liofilizado, extrato bruto liofilizado e enzima imobilizada), sendo estas conversões muito baixas, variando de 0,2 a 0,5 %, ou seja, as enzimas com ausência de possíveis interferentes que se liguem ao sítio ativo da enzima, fazendo com que ela perca sua atividade, conseqüentemente conduzindo à diminuição da conversão em ésteres. Quando Zenevicz (2011) produziu ésteres etílicos em solvente orgânico utilizando as lipases produzidas por fermentação em estado sólido de *Rhizopus sp.*, as conversões foram avaliadas nas mesmas condições de forma de obtenção como citado acima, e estas variaram de 0,1 a 3,7 %. Por outro lado, quando o mesmo autor estudou a esterificação enzimática utilizando gás GLP pressurizado como solvente ocorreu aumento nas conversões para as diferentes formas de obtenção para *Penicillium brevicompactum* (variando de 23,1 a 32,8 %) e *Rhizopus sp.* (variando de 26,1 a 28,7 %). Já quando Zenevicz (2011) avaliou a produção de ésteres etílicos em solvente orgânico utilizando as lipases comerciais, a lipase Novozym 435 imobilizada apresentou conversão de 22,3 %, seguidas da lipases CALB/PS - DVB (6,9 %) e CALB/PMMA - DVB (1,3 %).

Oliveira e Oliveira (2001) realizaram estudo de alcoólise enzimática do óleo de dendê e etanol em solvente orgânico n-hexano. Para a enzima Novozym 435 imobilizada as conversões em ésteres foram de 54,5 % a temperatura de 70 °C, concentração da enzima de 20 % (p/p), sem presença de água e razão óleo: etanol de 1:3.

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

Predabom (2011) realizou a alcoólise enzimática de diferentes óleos vegetais utilizando lipase de *Penicillium brevicompactum* fermentada em diferentes misturas de farelo.

As maiores conversões foram obtidas na amostra de extrato utilizando a mistura de farelo de arroz e casca de arroz (2,88 %) e na amostra de extrato da mistura de farelo de soja e casca de soja (2,48 %), ambas utilizando óleo de oliva como substrato para a alcoólise.

## 5 CONCLUSÕES

Após a realização deste estudo pode-se concluir que:

- a) Foi possível realizar a seleção de fungos filamentosos isolados de solo contaminado com óleo diesel e efluente de indústria de laticínios para a produção de lipases com atividade de esterificação via fermentação em estado sólido utilizando farelo de soja e casca de soja como substrato.
- b) Quatro fungos filamentosos foram selecionados como produtores de lipases com atividade de esterificação em 96 horas de fermentação, o fungo O<sub>4</sub> (*Aspergillus niger*) (364,58 U/g) e o fungo O<sub>5</sub> (*Aspergillus* sp.) (465,01 U/g), ambos isolados de solo, o fungo E<sub>13</sub> (*Trichoderma* sp.) (61,49 U/g) isolado de efluente e o fungo *Aspergillus fumigatus*, (182,92 U/g), este último disponível no Laboratório de Fermentações do Curso de Engenharia de Alimentos da UPF.
- c) As variáveis umidade, uréia, óleo de soja e farelo de soja avaliadas na produção de lipase mostraram influência sobre as atividades de esterificação, uma vez que variando os níveis estudados destas através de planejamentos fatoriais foi possível observar os efeitos que estas variáveis exercem sobre a atividade. Baseado nisso, apenas os fungos O<sub>4</sub> (*Aspergillus niger*) e *Aspergillus fumigatus* foram promissores para a produção de lipase com atividade de esterificação em condições de 65 % de umidade, 1 % de uréia, 1 % de óleo de soja e 80 % de farelo de soja.
- d) A lipase produzida pelo fungo O<sub>4</sub> (*Aspergillus niger*) apresentou especificidade pelo ácido oleico e pelo ácido butírico. A maior atividade de esterificação na reação com ácido oleico e com ácido butírico foi de 451, 50 e 661, 43 U/g, respectivamente. Estas atividades são referentes à amostra em que o pH do meio de fermentação não foi ajustado e feita a liofilização direta do farelo fermentado, ou seja, nestas condições de obtenção da enzima a lipase produzida por este microrganismo apresentou afinidade com ácido de cadeia longa (C18:1) e ácido de cadeia curta (C4:0), sendo mais específica.
- e) A lipase produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* apresentou especificidade pelo ácido oleico, uma vez que todas as amostras (lipases) produzidas por este

microrganismo apresentaram atividades de esterificação com este ácido, a maior atividade de esterificação foi de 395,43 U/g na amostra em que o pH do meio era de 4,5 e feita a liofilização direta do farelo fermentado, ou seja, nestas condições de processo a lipase produzida por este microrganismo apresentou afinidade com ácido de cadeia longa (C18:1). Apenas a amostra em que a lipase foi produzida no meio em que o pH do não foi ajustado e feita a liofilização direta do farelo fermentado apresentou especificidade com o ácido butírico (410, 75 U/g), ou seja, nestas condições de processo a lipase apresentou afinidade com ácido de cadeia curta (C4:0).

- f) A obtenção das lipases através da liofilização direta do farelo fermentado foi a melhor condição para produzir lipases com altas atividades de esterificação para ambos os microrganismos, visto que essa semi imobilização pode ter contribuído na manutenção da conformação da enzima.
- g) Na reação para produção de ésteres etílicos em solvente orgânico, a lipase produzida pelo fungo O<sub>4</sub> (*Aspergillus niger*) apresentou maior conversão (5,32 %) na amostra em que o pH do meio era 4,5 e feito a extração e liofilização da enzima. Já a lipase produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* apresentou maior conversão (2,55 %) na amostra em que o pH do meio era 4,5 e feito a liofilização como meio de cultivo (PES).
- h) Dessa forma, fica claro que diferentes microrganismos podem produzir lipases com atividade de esterificação, mas cada microrganismo requer condições específicas de processo, pois as lipases obtidas de diferentes fontes podem apresentar diferentes propriedades.

## **6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- a) Testar extração da enzima em diferentes pH;
- b) Testar o método de extração utilizando filtração por membrana;
- c) Estudo de suportes para imobilização da enzima; com objetivo de se obter enzimas com maior poder catalítico;
- d) Testar novos parâmetros e óleos vegetais para reação de alcoólise a fim de aumentar as conversões;
- e) Estudar a esterificação enzimática utilizando gás GLP pressurizado como solvente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, H.; 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.
- ALONSO, F. O. M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*** (IMUFRJ 50682). 2001. Dissertação (Mestrado). Centro de Ciência da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ.
- ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I. Continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*: culture stability and low-grade glycerol utilization. **Biotechnology Letters**. v. 25, n. 2, p. 121-125, 2003.
- ARROYO, M.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: effect of water activity on enzymatic activity in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 24, p. 3-12, 1999.
- AZEREDO, L. A. I.; GOMES, P. M.; SANT'ANNA, G. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. **Current Microbiology**. v. 54, p. 361-365, 2007.
- BACHA, A. B.; GARGOURI, Y.; ALI, Y. B.; MILED, N.; REINBOLT, J.; MEJDOUB, H. Purification and biochemical characterization of ostrich pancreatic lipase. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 37, p. 309-317, 2005.
- BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. **Microbiologia Básica**. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1998.
- BARCZA, V. M. **Esterificação**. Escola de Engenharia de Lorena – USP. Processos Unitários Orgânicos- PU191. Disponível em: <<http://www.dequi.eel.usp.br/~barcza/Esterificacao.pdf>>. Acesso em: Abril 2012.
- BARROS, N. B.; SCARMPINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas, Unicamp, 1996.
- BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 43, p. 453-460, 2000.
- BERTOLINI, M. C.; SCHRAG, J. D.; CYGLER, M.; THOMAS, D. Y.; VERNET, T. Expression in yeast, characterization and comparison of lipases from *Geotrichum candidum*. **European Journal of Biochemistry**. v. 228, n. 3, p. 863-869, 1995.

BORZEIX, F.; MONOT, F.; VANDECASTEELE, J. P. Strategies for enzymatic esterification in organic solvents: Comparison of microaqueous, biphasic, and micellar systems. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 14, n. 10, p. 791-797, 1992.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**. v. 42, n. 1, p. 98-101, 2007.

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

BURKERT, J. F. M. **Otimização das Condições de Produção da Lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552**. 2003. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas/SP.

BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**. v. 91, n. 1, p. 77-84, 2004.

CARVALHO, N. B.; SOUZA, R. L.; CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Sequential production of amylolytic and lipolytic enzymes by bacterium strain isolated from petroleum contaminated soil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 150, n. 1, p. 25-32, 2008.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D'A.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Reações catalisadas por lipases para concentração de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**. v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BUARQUE, E. A.; SANT'ANNA JR, G.L., FREIRE, D. M. G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**. v. 4, n. 3, p. 239-247, 2000.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTO, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**. v. 27, n. 1, 2004.

CAVALCANTI, E. A. C.; GUTARRA, M. L. E.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R.; SANT'ANNA G.L. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, p. 79-84, 2005.

CHARTRAIN, M.; KATZ, L.; MARCIN, C.; THIEN, M.; SMITH, S.; FISHER, E.; GOKLEN, K.; SALMON, P.; BRIX, T.; PRICE, K.; GREASHAM, R. Purification and characterization of a novel bioconverting lipase from *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 15, n. 7, p. 575-80, 1993.

CHEN, C. S.; SIH, C. J. General aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvent. **Angewandte Chemie International Edition in English**. v. 28, n. 6, p. 695-707, 1989.

- CHEN, H. Z.; XU, J.; LI, Z. H. Temperature control at different bed depths in a novel solid-state fermentation system with two dynamic changes of air. **Biochemical Engineering Journal**. v. 23, n. 2, p. 117-122, 2005.
- CHINN, M. S.; NOKES, S. E.; STROBEL, H. J. Influence of moisture content and cultivation duration on *Clostridium thermocellum* 27405 end-product formation in solid substrate cultivation on Avicel. **Bioresource Technology**. v. 99, n. 7, p. 2664-2671, 2008.
- 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, n. 4, p. 331-339, 2001.
- CHULALAKSANANUKUL, W.; CONDORET, J. S.; COMBES, D. Geranyl acetate synthesis by lipase catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 15, n. 8, p. 691-698, 1993.
- COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening alkaline lipase-production fungi from Brazil soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 22, n. 8, p. 881-885, 2006.
- COLLA, L. M.; REZZADORI, K.; CÂMARA, S. K.; DEBON, J.; TIBOLLA, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. A solid-state bioprocess for selecting lipase-producing filamentous fungi. **Journal of Bioscience**. v. 64c, p. 131-137, 2009.
- CONTESINI, F. J.; CARVALHO, P. O. Esterification of (RS)-Ibuprofen by native and commercial lipases in a two-phase system containing ionic liquids. **Tetrahedron: Asymmetry**. v. 17, n. 14, p. 2069-2073, 2006.
- CORDOVA, J.; NEMMAOUI, M.; ISMAÏLI-ALAOUI, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 5, p. 75-78, 1998.
- COSTA, V. E. U.; AMORIN, H. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**. São Paulo, v. 22, n. 6, 1999.
- COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. **Journal of Food Engineering**. v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.
- DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 26, p. 657-663, 2000.
- DI LUCCIO, M.; CAPRA, F.; RIBEIRO, N. P.; VARGAS, G. D. L. P.; FREIRE D. M. G.; OLIVEIRA D. Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 113, n. 1-3, p. 173-180, 2004.

DIAZ, J. C.; RODRIGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, n. 5, p. 1042-1050, 2006.

DOMINGUEZ, 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, n. 15, p. 1225-1229, 2003.

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

DUTRA, C. V.; TERZI, C.; BEVILAQUA, J. V.; DAMASO, M. C. T.; COURI, S.; LANGONE, M. A. P.; SENNA, L. F. Lipase production in solid-state fermentation monitoring biomass growth of *Aspergillus niger* using digital image processing. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 147, p. 63-75, 2008.

DZIEZAK, J.D. Enzymes: catalyses for food processes. **Food Technology**. v. 45, p. 78-85, 1991.

ECHEVARRIA, J.; LEON, J. A. R.; ESPINOSA, M. E.; DELGADO, G. Optimization of solid state fermentation of sugarcane by *Aspergillus niger* considering the particle size effect. **Acta Biotechnologica**, v. 11, n. 1, p.15-22, 1991.

ELLAIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; THAER TALEB, A.; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**. v. 39, n. 5, p. 525-528, 2004.

ESSAMRI, M.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. **Journal of Biotechnology**. v. 60, p. 97-103, 1998.

FACCIO, C. **Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim/RS.

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

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2007. Tese (Doutorado em Química). Área de Concentração de Química Orgânica. Universidade Federal do Paraná. Curitiba/PR.

FERRAZ, L. R.; OLIVEIRA, D. S.; SILVA, M. F.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and

sugarcane bagasse as substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 1, n. 3, p. 243-252, 2012.

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

FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 81, p. 48-56, 2000.

GANDHI, N. N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**. Chicago. v. 74, n. 6, p. 621-634. 1997.

GHANEM, A.; ABOUL-ENEIM, H.Y. Application of lipases in kinetic resolution of racemates. **Chirality**. v. 17, n. 1, p. 1-15, 2005.

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

GONÇALVES, F. A. G. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Ciências de Alimentos. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte/MG.

GONZÁLEZ, B. J.; GONZÁLEZ, H.; MEJÍA, A. Effect of size particle, packing density and agitation on *Penicillium* production in solid state fermentation. **Biotechnology Advances**. v. 11, n. 3, p. 539-547, 1993.

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

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

GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOGLU, U. The production of isoamyl Acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. **Process Biochemistry**. v. 38, n. 3, p. 379-386, 2002.

HADEBALL, W. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*, I. Lipases from yeasts: Review. **Acta Biotechnologica**. v. 11, n. 2, p. 159-67, 1991.

HAMA, S.; YAMAJI, H.; FUKUMIZU, T.; NUMATA, T.; TAMALAMPUDI, S.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**. v. 34, n. 3, p. 273-278, 2007.

HAN, Y.W.; GALLAGHER, D.J.; WILFRED, A. G. Phytase production bt *Aspergillus ficuum* on semisolid substrate. **Journal of Industrial Microbiology**. v. 2, p. 195-200, 1987.

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

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, n. 1, p. 61-68, 2002.

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.

HILAL, N.; KOCHKODAN, V.; NIGMATULLIN, R.; GONCHARUK, V.; AL-KHATIB, L. Lipase immobilized biocatalytic membranes for enzymatic esterification: comparison of various approaches to membrane preparation. **Journal of Membrane Science**. v. 268, n. 2, p. 198-207, 2006.

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 64, n. 2, p. 175-186. 2004.

HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation are there any biotechnological advantages?. **Current Opinion in Microbiology**. v. 8, n. 3, p. 301-306, 2005.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANE, D. Lipases and their applications: an overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 118, n. 1-3, p. 155-170, 2004.

IBRAHIM, C. O. Development of applications of industrial enzymes from Malaysian indigenous microbial sources. **Bioresource Technology**. v. 99, n. 11, p. 4572-4582, 2008.

IIZUMI, T.; NAKAMURA, K.; FUKASE, T. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. **Agricultural Biological Chemistry**. v. 54, p. 1253-1258, 1990.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

JESUS, M. F. C. P.; BRANCO, R. N.; SANT'ANNA, J. G. L.; FREIRE, D. M. G.; SILVA, J. J. G. *Penicillium restrictum* lipases: a comparative study and characterization of enzymes with different degrees of purity. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 16, n. 2, p. 113-118, 1999.

JENSEN, R. G. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. **Chemistry and Materials Science**. v. 18, n. 9, p. 650-657, 1983.

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.

- KEMPKA, A. P.; LIPKE, N. L.; PINHEIRO, T. L. F.; MENONCIN, S.; TREICHEL, H.; FREIRE, D. M. G.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess Biosystems Engineering**. v. 31, n. 2, p. 119-125, 2008.
- KIM, J. H.; HOSOBUCHI, M.; KISHIMOTO, M.; SEKI, T.; YOSHIDA, T.; TAGUCHI, H. Cellulase production by a solid state culture system. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 27, n. 10, p. 1445-1450, 1985.
- KOJIMA, Y.; SHIMIZU, S. Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU 380. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 96, n. 3, p. 219-226, 2003.
- KRIEGER, N.; TAIPA, M. A.; MELO, E. H. M.; LIMA, J. L.; Barros M. R. A.; CABRAL, J. M. S. Purification of *Penicillium citrinum* lipase by chromatographic processes. **Bioprocess Engineering**. v. 20, p. 59-65, 1999.
- KRISHNA, S. H.; KARANTH, N.G. Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media, Catalysis Reviews. **Science and Engineering**. v. 44, p. 499-591, 2002.
- KUMAR, K. S. V.; RAMASUBHAN, B.; LAKSHMI, B. S.; GAUTAM, P. Sensitive assay for lipase using tetra sulfonatophenyl porphyrin. **Analytical Biochemistry**. v. 356, pg. 294-296, 2006.
- KUSDIANA, D.; SAKA, S. Methyl esterification of free fatty acids of rapeseed oil as treated in supercritical methanol. **Journal of chemical Engineering of Japan**, v. 34, p. 383-387, 2001.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M.; **Princípios de Bioquímica**. Tradução da 2ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- 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, n. 1, p. 98-102, 2006.
- LIN, S. F. Production and stabilization of a solvent tolerant alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 82, n. 5, p. 448-451, 1996.
- LIU, B. L.; TZENG, Y. M. Water content and water activity for the production of cyclodepsipeptide in solid state fermentation. **Biotechnology Letters**. v. 21, p. 657-661, 1999.
- LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid state fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 7, n. 6, p. 258-265, 1985.
- LOTTI, M.; MONTICELLI, S.; MONTESINOS J. L.; BROCCA, S.; VALERO, F.; LAFUENTE, J. Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 93, p. 148-148, 1998.

- 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. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 73, n. 2, p. 349-355, 2006.
- MACARIE, A. E.; BARATTI, J. Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 10, n. 4, p. 377-383, 2000.
- MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. Biodiesel: Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais. **Biociência e Desenvolvimento**. v. 32, p. 38-46, 2004.
- MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**. v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.
- MAIA, M. M. D.; HEASLEY, A.; CAMARGO DE MORAIS, M.M.; MELO, E. H. M.; MORAIS JR, M. A.; LEDINGHAM, W. M.; LIMA FILHO, J. L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**. v. 76, n. 1, p. 23-27, 2001.
- MAKHSUMKHANOV, A. A.; YAKUBOV, I. T.; DAVRANOV, K. Conditions for cultivation of the fungus *Penicillium melinii* UZLM-4 and its biosynthesis of lipases. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 40-43, 2003.
- MALA, J. G. S.; EDWINOLIVER, N. G.; KAMINI, N. R.; PUVANAKRISHNAN, R. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. **The Journal of General and Applied Microbiology**. v. 53, n. 4, p. 247-253, 2007.
- MALDONADO, R. R. *Produção, Purificação e Caracterização da lipase de Geotrichum candidum obtida a partir de meios industriais*. 2006. Dissertação de Mestrado. UNICAMP, São Paulo/SP.
- MALDONADO, R. R.; BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Estudo da produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 em frascos agitados utilizando meios industriais. **VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa**. p. 121, 2002.
- MAREK, A.; BEDNARSKI, W. Some factors affecting lipase production by yeasts and filamentous fungi. **Biotechnology Letters**. v. 18, n. 10, pg. 1155-1160, 1996.
- MARIA, P. D.; ALZAMORA, F. M.; MORENO, S. P.; VALERO, F.; RUA, M. L.; MONTEIRO, J. M. S.; SINISTERRA, J. V.; ALCANTARA, A.R. Heptyl oleate synthesis as useful tool to discriminate between lipases, proteases and other hydrolases in crude preparations. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, n. 3, p. 283-288, 2002.
- MARIA, P. D.; SINISTERRA, J. V. Causes of unreproducibility of *Candida rugosa* lipase-catalyzed reactions in slightly hydrated organic media. **Tetrahedron**. v. 55, p.8555-8566, 1999.

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***. 2001. Dissertação (Mestrado em Centro de Ciências da Saúde). Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RS.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biosurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**. v. 31, p. 1942-1947, 2008.

MIRANDA, O. A.; SALGUEIRO, A. A.; PIMENTEL, M. C. B.; FILHO, J. L.; MELO, E. H. M.; DURÁN, N. Lipase production by Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. **Bioresource Technology**. v. 69, n. 5, p. 145-147, 1999.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**. v. 68, p. 61-138, 2000.

MONOT, F.; BORZEIX, F.; BARDIN, M.; VANDECASTEELE, J. P. Enzymatic esterification in organic media: Role of water and organic solvent in kinetics and yield of butyl butyrate synthesis. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 35, p. 759-765, 1991.

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

NAWANI, N.; DOSANJH, N. S.; KAUR, J. A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. **Biotechnology Letters**. v. 20, n. 10, p. 997-1000, 1998.

NAWANI, N.; KAUR, J. Purification characterization and thermostability of a lipase a thermophilic *Bacillus* sp. J33. **Biomedical and Cellular Biochemistry**. v. 206, n. 1-2, p. 91-96, 2000.

NIGAM, P.; SINGH, D. Solid state (substrate) fermentation systems and their application in biotechnology. **Journal of Basic Microbiology**. v. 34, n. 6, p. 404-423, 1994.

OLIVEIRA D.; OLIVEIRA, J. V. Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexane and SCCO<sub>2</sub>. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 19, p. 141-148, 2001a.

OLIVEIRA, A. C.; ROSA, M. F.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S. Enzymatic esterification of ethanol and oleic acid—a kinetic study. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 11, p. 999-1005, 2001b.

OZYILMAZ, G.; EZER, G. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 64, n. 3-4, p. 140-145, 2010.

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 water of industrial babassu oil production as substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 84-86, p. 1137-1145, 2000.

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

PANDEY, A.; ASHAKUMARY, L.; SELVAKUMAR, P.; VIJAYALAKSHMI, K. S. Influence of water activity on growth and activity of *Aspergillus niger* for glucoamylase production in solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.10, p. 485-486, 1994.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzyme. **Current Science**. v. 77, n. 1, p.149-162, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I—bioprocesses and products. **Process Biochemistry**. v. 35, n. 10, p. 1153–1169, 2000a.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAN, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential agroindustrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**. v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000b.

PAQUES, F. W.; MACECO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**. v. 20, n. 1, p. 93-99, 2006.

PASTORE, G. M.; DA COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, n. 2, p. 135-140, 2003.

PASTRANA, L. M.; GONZALEZ, M. P.; PINTADO, J.; MURADO, M. A. Interactions affecting gibberellic acid production in solid state culture: A factorial study. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 17, n. 9, p. 784-790, 1995.

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

PENCREAC'H, G.; BARATTI, J. C. Comparison of hydrolysis activity in water and heptane for thirty-two commercial lipase preparations. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 28, p. 473-479, 2001.

PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; PATRICK ADLERCREUTZ P. Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**. 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. 19-20, p. 467-472, 2002.

PINHEIRO, T. L. F.; MENONCIN, S.; DOMINGUES, N. M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M.; FREIRE, D. M. G. Produção e caracterização parcial de lipase de *Penicillium verrucosum* obtido por fermentação submersa de meios convencionais e industriais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 28, n. 2, p. 444- 450, 2008.

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, n. 2, p.1077-108, 2003.

PREDABON, S. M. **Produção e caracterização parcial de lipase produzida por *Penicillium brevicompactum* em bioreator de leito fixo utilizando resíduos agroindustriais como substrato**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões- URI, Erechim/RS.

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.

RAHARDJO, Y. S. P.; JOLINK, F.; HAEMERS, S.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Significance of bed porosity, bran and specific surface area in solid-state cultivation of *Aspergillus oryzae*. **Biomolecular Engineering**. v. 22, n. 4, p. 133-139, 2005.

RAHMAN, R. N. Z. R. A.; LEOW, T. C.; SALLEH, A.B.; BASRI, M. *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia. **Microbiology**. v. 7, p. 77, 2007.

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

RAMACHANDRAN, S.; SINGH, S. K.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Oil cakes and their biotechnological applications: A review. **Bioresource Technology**. v. 98, n. 10, p. 2000-2009, 2007.

RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMINGOS, A. K.; WILHEIM, H. M. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 31, p. 27-37, 2003.

RICHETTI, A. **Resterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente**. 2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ.

RIEGEL, R. E. **Bioquímica**. São Leopoldo: UNISINOS, 1996.

RIGO, E. **Produção e caracterização parcial de lipases com atividade de hidrólise e síntese por fermentação em estado sólido**. 2009. Tese (Doutorado), Departamento de Química e Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC.

ROBINSON, T.; NIGAN, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 197-203, 2003.

RODRIGUEZ, J. A.; MATEOS, J. C.; NUNGARAY, J.; GONZÁLEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**. v. 41, n. 11, p. 2264-2269, 2006.

RÚA, M. L.; BALLESTEROS, A. A rapid purification of two lipase isoenzyme from *Candida rugosa*. **Biotechnology Techniques**. v. 8, n. 1, p. 21-26, 1994.

SABIONI, J. G. Contribution of lipolytic and proteolytic activity in the development of flavour in cheeses and the development of aromatic milk-based products. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 54, n. 312, p. 30-39, 2000.

SABUQUILLO, P.; REINA, J.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Interfacial affinity chromatography of lipase: Separation of different fractions by selective adsorption on supports activated with hydrophobic groups. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure and Molecular Enzymology**. v. 1388, n. 2, p. 337-348, 1998.

SANGSURASAK, P.; MITCHELL, D. A. Validation of model describing two-dimensional heat transfer during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 60, n. 6, p. 739-749, 1998.

SANTOS, M. M.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; BARATTI, J. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Determination of lipase activity using image analysis. **Analytical Biochemistry**. v. 351, p. 305-307, 2006.

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

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**. v. 52, n. 1, p. 1-18, 2003.

SCHMIDELL, W.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial**. v. 2. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001.

SHAH, S.; SHARMA, S.; GUPTA, M. N. Enzymatic transesterification for biodiesel production. **Indian Journal of Biochemistry Biophysics**. v. 40, p. 392-399, 2003.

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

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 and Biosystems Engineering**. v. 34, n. 2, p. 145-152, 2011.

- SMANIOTTO, A. **Produção e caracterização parcial de uma ‘lipase sintética’ produzida por uma nova cepa de *Sporobolomyces ruberrimus***. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional do Alto Uruguai das Missões Campus, Erechim/RS.
- SNELLMAN, E. A.; SULLIVAN, E. R.; COLWELL, R. R. Purification and properties of the extracellular lipase, Lip A, of *Acinetobacter* sp. **Biochemical Engineering Journal**. v. 11, p. 269-274, 2002.
- SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R. Triglycerides: based diesel fuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 4, n. 2, p. 111-333, 2000.
- 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, 2009a.
- SUN, S. Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. **Bioresource Technology**. v. 100, n. 9, p. 2607- 2612, 2009b.
- TAKAÇ, S.; MARUL, B. Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 35, n. 9, p. 1019-1025, 2008.
- TAWAKI, S. H.; KLIBANOV, A. M. Chemo selectivity of enzymes in anhydrous media is strongly solvent dependent. **Biocatalysis**. v. 8, p. 3–19, 1999.
- TENGERDY, R. P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 169-179, 2003.
- TOIDA, J.; ARIKAWA, Y.; KONDOU, K.; FUKUZAWA, M.; SEKIGUCHI, J. Purification and characterization of lipase from *Aspergillus oryzae*. **Bioscience biotechnology biochemistry**. v. 62, n. 4, p. 759-763, 1998.
- TORRES, M.; DOLCET, M. M.; SALA, N.; CANELA, R. Endophytic fungi associated with Mediterranean plants as a source of mycelium-bound lipases. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 3328-3333, 2003.
- TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 1999.
- TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, V. J. A Review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**. v. 3, n. 2, pg. 182-196, 2010.
- UL-HAQ, I.; IDREES, S.; RAJOKA, M. I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**. v. 37, p. 637-341, 2002.

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, n. 1, p. 47-54, 2008.

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

VRANESIC, D.; KURTANJEK, Z.; SANTOS, A. M. P.; MAUGERI, F. Optimization on inulinase production by *Kluyveromyces bulgaricus*. **Food Technology and Biotechnology**. v. 40, n. 1, p. 67-73, 2002.

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.

WOLSKI, E. **Estudo comparativo da produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Penicillium sp.* livre e imobilizado**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Ciências Agrárias. Universidade Regional Integrada, Erechim/RS.

WU, X. Y.; JAASKELAINEN, S.; LINKO, Y. Y. An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 19, n. 3, p. 226-231, 1996.

XU, Y. Y.; DU, W.; LIU, D. H.; ZENG, J. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. **Biotechnology Letters**. v. 25, p. 1239-1241, 2003.

XU, Y.; WANG, D.; MU, X. Q.; ZHAO, G. A.; ZHANG, K. C. Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 18, p. 29-37, 2002.

YANG, F.; RUSSEL, A. J. A comparison of lipase-catalyzed ester hydrolysis in reverse micelles, organic solvents, and biphasic systems. **Biotechnology Bioengineering**. v. 47, p. 60-70, 1995.

ZENEVICZ, M. C. P. **Avaliação da atividade enzimática de lipases e aplicações em reações de interesse utilizando GLP pressurizado**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional do Alto Uruguai das Missões Campus de Erechim/RS.

ZHANG, Y.; DUBÉ, M. A.; MCLEAN, D. D.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil. 1. Process design and technological assessment. **Bioresource Technology**. v. 89, n. 1, p. 1-16, 2003.

ZHU, K.; JUTILA, A.; TUOMINEN, E. K. J.; PATKAR, S. A.; SVENDSEN, A.; KINNUNEN, P. K. J. Impact of the tryptophan residues of *Humicola lanuginosa* lipase on its thermal stability. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure and Molecular Enzymology**. v. 1547, n. 2, p. 329-338, 2001.