

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

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LIPASES DE *Sporobolomyces ruberrimus* UTILIZANDO COMO SUBSTRATOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Lenir Rigoli Ferraz

Erechim, RS
Agosto de 2010

LENIR RIGOLI FERRAZ

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LIPASES DE *Sporobolomyces ruberrimus* UTILIZANDO COMO SUBSTRATOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

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

Orientadoras: Débora de Oliveira

Helen Treichel

**Erechim, RS
Agosto de 2010**

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tornar tudo possível...

Aos grandes amores da minha vida, Felipe e Bibiano, meu filho e meu marido, por estarem ao meu lado, incondicionalmente, em todos os momentos, abrindo mão muitas vezes dos seus desejos.

À toda minha família, especialmente meus pais que apesar de estarem longe, estão no coração e não mediram esforços sempre que necessário.

À Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, mais precisamente ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realização desse trabalho.

Às minhas orientadoras Débora de Oliveira e Helen Treichel, pela paciência e disposição para auxiliar na construção desse trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos: Silvana Menoncin, Morgana Maloz, Jamile Zeni, Aline Richetti, Lindomar Lerin, Marcell Fernandes, Viviane Astolfi, Jonaína Gomes, Robison Scherer, Alessandra Smaniotto, Daniela (Peke), Gabriela, Simone, Sheila, Aline e Ricardo.

Ao pessoal do Laboratório de Termodinâmica.

Ao pessoal da Central de Materiais pela disponibilidade.

À equipe diretiva da escola João Caruzo, em especial ao Diretor César e às Vice-Diretoras Ivete e Saionara, pela compreensão e incentivo, minha gratidão.

Aos meus queridos sogros Lurdes e Bibiano, pelo apoio e palavras de incentivo que me acrescentaram muito.

Aos meus queridos amigos Dieter e Maria Luiza Kepler, pelo amor, carinho, amizade e pelas orações.

À grande amiga Beranice Moura, que apesar de estar longe, se mostra presente, minha gratidão pelas nossas conversas e reflexões.

À amiga Denize Pedroni pelo apoio, conversas descontraídas e grande amizade.

À minha amiga Daniela de Oliveira, companheira de estudo, pelos conselhos e amizade.

À querida ajudante Catiane, pela disposição e inestimável ajuda na realização experimental desse trabalho, e também pela amizade.

Às secretárias do Mestrado em Engenharia de Alimentos, Karine, Andréia e Cláudia pela disponibilidade e competência.

Aos demais professores do Curso de Engenharia de Alimentos, especialmente Geciane Toniazzo, Eunice Valduga, Márcio Mazutti, Vladimir de Oliveira, Marco Di Luccio e Rogério Cansian.

RESUMO

As lipases constituem, atualmente, um importante grupo de enzimas com enorme potencial para aplicações biotecnológicas. As lipases (EC 3.1.1.3) pertencem à família das hidrolases e estão associadas ao metabolismo e à hidrólise dos lipídios, amplamente distribuídos na natureza. Atuam, por definição, na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas e liberando ácidos e álcoois orgânicos. Entretanto, a reação inversa, esterificação, pode ocorrer em ambientes com restrição de água. Desta forma, as lipases vêm se destacando cada vez mais no cenário da biotecnologia enzimática por serem enzimas versáteis que aceitam uma ampla variedade de substratos. O objetivo deste trabalho foi investigar a produção de lipase por uma nova cepa isolada, *Sporobolomyces ruberrimus*, utilizando diferentes substratos (farelo de soja, farelo de arroz e bagaço de cana) em fermentação em estado sólido. Esta cepa apresenta habilidade catalítica potencial para reações de esterificação. De forma a maximizar a atividade enzimática, esse trabalho foi primeiramente focado na otimização da produção de lipase pela técnica de planejamento de experimentos. O melhor tempo de fermentação para cada substrato foi obtido através da avaliação da cinética de produção (48 horas para farelo de soja e farelo de arroz e 72 horas para bagaço de cana) e as melhores atividades de esterificação foram de 116,35, 128,88 e 269,39 U/g de substrato seco (gss) para bagaço de cana, farelo de arroz e farelo de soja, respectivamente. Os efeitos das variáveis de processo para maximização da produção das enzimas foram investigados. A condição otimizada para a produção de lipase foi umidade 60% e temperatura de 30°C, tanto para o farelo de soja como para o farelo de arroz e para o bagaço de cana conduziram a atividades de 169,33U/g. As enzimas produzidas foram caracterizadas parcialmente em relação à estabilidade em temperaturas altas e baixas, especificidade ao substrato de esterificação (diferentes ácidos graxos e álcoois) e faixas de temperatura de atuação e memória de pH. As enzimas apresentaram, em geral, maior especificidade pelos ácidos graxos e álcoois de cadeia mais curta, maior estabilidade térmica, em temperatura ambiente e de congelador. O extrato enzimático obtido apresentou as maiores atividades em temperatura de cerca de 40°C e memórias de pH próximas à neutralidade (6,5).

ABSTRACT

Lipases (triacylglycerol hydrolases, E.C. 3.1.1.3) are a part of the hydrolase family which act in carboxylic ester bonds and have been standing out in the biotechnology field as they are versatile enzymes that accept a wide range of substrates. They act, by definition, in the organic-water interface, catalyzing the carboxylic ester bonds hydrolysis and releasing alcohols and organic acids. However, the esterification inverse reaction can occur in water restricted environments. The objective of this work was to investigate the lipase production by a newly isolated strain of *Sporobolomyces ruberrimus*, using different substrates (soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse) in solid state fermentation. This strain presents potential catalysis ability for esterification reactions. Aiming at maximizing the esterification activity, this work was first focused on the optimization of lipase production by the methodology of experimental design. The fermentation time for each substrate was established by the kinetic evaluation (48 hours for soybean meal and rice meal and 72 hours for sugarcane bagasse) and the highest esterification activities were 116.35, 128.88 and 269.39U/g of dry substrate for sugarcane bagasse, rice meal and soybean meal, respectively. The effects of process variables on enzyme production were investigated. The optimized condition for lipase production was moisture content of 60% and temperature of 30°C for all tested substrates. The enzymes produced were partially characterized in terms of stability in high and low temperatures, esterification substrate specificity (different fatty acids and alcohols) and acting ranges of pH memory and temperature. The lipases presented, in general, higher specificity to short chain alcohols and fatty acids and higher thermal stability at 4°C and room temperature. The crude enzymatic extract presented higher activities at 40°C and memories of pH around neutrality (6.5).

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 ENZIMAS.....	5
2.2 LIPASES: DEFINIÇÃO.....	6
2.3 LIPASES DE MICRO-ORGANISMOS.....	7
2.3.1 Leveduras.....	8
2.3.2 Fungos filamentosos.....	10
2.3.3 Bactérias	10
2.4 APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DAS LIPASES	11
2.5 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	12
2.5.1 Características da fermentação em estado sólido.....	16
2.6 IMPORTÂNCIA INDUSTRIAL DE ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS.....	19
2.7 CARACTERIZAÇÃO DE LIPASES.....	21
2.7.1 Especificidade pelo substrato.....	21
2.7.2 Estabilidade térmica.....	22
2.7.3 Efeitos de temperatura e memória de pH.....	23
2.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 MATERIAIS.....	25
3.2 EQUIPAMENTOS.....	25
3.3 MÉTODOS.....	26
3.4 MICRO-ORGANISMO.....	27
3.5 MANUTENÇÃO DAS CEPAS.....	27
3.6 PRODUÇÃO DE INÓCULO.....	27

3.7 SUBSTRATOS.....	27
3.8 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS.....	28
3.8.1 Umidade.....	28
3.8.2 Cinzas.....	29
3.8.3 Lipídios.....	29
3.8.4 Nitrogênio.....	30
3.8.5 Proteínas.....	30
3.8.6 Minerais.....	30
3.8.7 Determinação do pH.....	31
3.9 PRODUÇÃO DE LIPASES.....	31
3.9.1.1 Fermentação em Estado Sólido (FES).....	31
3.9.1.2 Cinética da produção de lipase.....	32
3.9.1.3 Otimização da produção de lipase.....	32
3.9.2 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	33
3.9.2.1 Processo de extração da enzima.....	33
3.9.2.2 Determinação da atividade de esterificação.....	33
3.9.2.3 Crescimento microbiano.....	34
3.9.3 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS LIPASES PRODUZIDAS.....	35
3.9.3.1 Especificidade aos substratos de esterificação.....	35
3.9.3.2 Estabilidade em diferentes temperaturas.....	35
3.9.3.3 Efeito da temperatura e memória de pH na atividade lipásica.....	36
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO.....	37
4.2 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE LIPASE.....	39
4.2.1 Cinética da produção de lipase.....	39
4.2.2 Otimização da produção de lipase.....	40
4.3 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS LIPASES PRODUZIDAS.....	48
4.3.1 Especificidade aos substratos de esterificação.....	49
4.3.2 Estabilidade em diferentes temperaturas.....	53
4.3.2.1 Estabilidade em altas temperaturas.....	54

4.3.2.2 Estabilidade em baixas temperaturas e temperatura ambiente.....	58
4.3.3 Efeito da temperatura e memória de pH na atividade lipásica.....	62
5.CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	69
5.1 CONCLUSÕES.....	69
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
7. ANEXOS	
7.1 ANEXO I	89

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são um tipo especial de proteínas produzidas dentro das células dos organismos vivos, as quais apresentam atividade catalítica. A aplicação industrial de enzimas tem sido impulsionada com o aumento da preocupação com as questões ambientais, com a qualidade do produto e com a redução dos gastos em setores industriais. Atualmente a tecnologia enzimática é uma alternativa para substituir processos químicos por processos biocatalisados, uma vez que estes últimos possuem menor impacto ambiental e são mais limpos.

A biocatálise e a tecnologia enzimática são ferramentas promissoras para síntese de compostos de alto valor agregado. As lipases destacam-se entre as principais enzimas utilizadas em biocatálise, pois apresentam capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, onde o teor de água é limitado. Além disso, o elevado potencial de aplicação das lipases é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos e sua quimio-regio e enantiosseletividade (Hasan *et al.*, 2006, Krieger *et al.*, 2004).

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas cuja função principal é catalisar a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa de interface água-lipídios. Na área de química orgânica, as lipases são bem conhecidas e atraentes entre os biocatalisadores mais amplamente utilizados, pois podem catalisar várias reações em meios não aquosos, tais como esterificação e transesterificação (Haki e Rakshit, 2003; Reetz, 2002; Silva *et al.*, 2001). A capacidade para executar a reação de síntese de ácidos graxos e álcoois tornou estes catalisadores amplamente utilizados para produzir tais compostos (Abbas e Comeau, 2003, Treichel *et al.*, 2010, Sun e Xu, 2008). Há um interesse crescente no desenvolvimento de aplicações de lipases em transformações oleoquímicas visando a obtenção de ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, como os ésteres de ácidos graxos monoalquil. A utilização de lipases como catalisadores para a produção de biodiesel, definido como ésteres de ácidos graxos é uma tecnologia limpa devido a sua atoxicidade que exige condições de funcionamento suaves comparado com o método químico (Dutra *et al.*, 2008).

As enzimas lipolíticas são produzidas por animais, plantas e micro-organismos (Treichel *et al.*, 2010, Dutra *et al.*, 2008). São encontradas em plantas,

exemplo da espécie *Vernonia galamensis* (Ncube e Read, 1995), no pâncreas suíno, além de serem produzidas por muitos micro-organismos, tais como, *Bacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*. Lipases microbianas 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-enântio seletividade na resolução de misturas racêmicas, além de facilidade de produção em grande quantidade (Hansan *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 (Freire e Castilho, 1999; Sharma *et al.*, 2001). Podem ser aplicadas na indústria oleoquímica em processos que consomem grande quantidade de energia como hidrólise, glicerólise e alcoólise, na produção de ácidos graxos poliinsaturados (aditivos de alimentos), na indústria têxtil (melhoria da qualidade e propriedade dos tecidos), na modificação de sabores (no processo de fermentação do salame e vinho) (Hasan *et al.*, 2006). Têm sido amplamente utilizadas na modificação de gorduras e óleos.

O interesse por estas enzimas tem aumentado significativamente nas últimas décadas, por serem aplicáveis também em medicamentos (enzimas digestivas) e agentes de limpeza (Alkan *et al.*, 2007). Pelo fato desta enzima possuir habilidade de catalisar reações em meios orgânicos, favorecida pelos baixos conteúdos de água presentes nas reações (Ruiz *et al.*, 2008), elas podem ser usadas na indústria de aditivos, detergentes, aromas, e até mesmo no tratamento de efluentes gordurosos (Rigo *et al.*, 2008).

A maioria das pesquisas tem se concentrado na lipases extracelulares produzidas por uma variedade de micro-organismos, incluindo bactérias, fungos, leveduras e actinomicetos (Alkan *et al.*, 2007). Dentre o elevado número de lipases descritos na literatura, apenas enzimas pertencentes a algumas espécies têm demonstrado ter estabilidade suficiente e capacidade biossintética para utilização em reações orgânicas. As espécies mais produtivas pertencem aos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor*. No entanto, as lipases comerciais atualmente disponíveis são caras e inadequadas para a produção de biodiesel (Dutra *et al.*, 2008).

Os resíduos gerados nos processos agroindustriais podem ser usados como substrato para o crescimento celular. A matéria orgânica presente nestes substratos é usada como fonte de energia para o crescimento e de carbono para a síntese de biomassa celular e dos produtos do metabolismo microbiano (Silva *et al.*, 2005). Portanto, a matriz sólida pode ser a fonte de nutrientes, que permitirá o desenvolvimento dos micro-organismos (Singhania, *et al.*, 2008).

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

Os processos biotecnológicos, especialmente a técnica de FES, têm contribuído enormemente para tal utilização (Treichel *et al.*, 2010; Alkan *et al.*, 2007). A fermentação em estado sólido (FES) foi definida como o processo de fermentação que envolve a matriz sólida e pode ser realizado em condições de baixa aw, porém o substrato deve possuir umidade suficiente para dar suporte ao crescimento e ao metabolismo do micro-organismo (Singhania *et al.*, 2008). Uma das principais características da FES é a utilização de substratos com baixa atividade de água. Somente as leveduras e os fungos filamentosos, baseando-se na classificação teórica, seriam micro-organismos capazes de se desenvolver na FES (Pandey, 2003).

Este modo de cultura oferece muitas vantagens sobre o processo de fermentação submersa (FS), tais como maior concentração na recuperação do produto, menor geração de resíduos, redução do consumo de água, e a possibilidade de utilização de subprodutos como substratos (Dutra *et al.*, 2008). Além disso, FES se assemelha ao habitat natural dos micro-organismos e, portanto, gera produtos de alto valor agregado (Singhania *et al.*, 2008).

Devido à especificidade das lipases e sua ampla aplicação tecnológica, verifica-se que é necessário pesquisar novas cepas de micro-organismos produtores desta importante classe de enzimas. Percebeu-se a necessidade de avaliar a produção de lipases por leveduras principalmente por apresentarem características específicas, além de não existirem muitos estudos nessa área

envolvendo leveduras. Sabe-se hoje que a habilidade das leveduras para sintetizar lipases está limitada aos gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Torulopsis* e *Yarrowia*. Enquanto as lipases de muitas espécies de bactérias e fungos filamentosos são produzidas em grandes quantidades em escala industrial, apenas a lipase da levedura *Candida rugosa*, primeiramente denominada *C. cylindracea*, tem tido papel de destaque quanto às suas aplicações (Hadeball, 1991). As lipases de levedura de *Candida rugosa* e *Candida antarctica* são as principais fontes de muitas lipases disponíveis comercialmente (Gupta, 2008; Treichel *et al.*, 2010).

Com base no exposto anteriormente, o presente trabalho tem como objetivo geral otimizar a produção de lipase obtida por fermentação em estado sólido da levedura *Sporobolomyces ruberrimus* utilizando como substratos farelo de arroz, bagaço-de-cana de açúcar e farelo de soja em fermentação estado sólido.

Como objetivos específicos pode-se citar: caracterização dos substratos utilizados no processo de fermentação, otimização das condições de fermentação e caracterização parcial das enzimas produzidas em termos de temperatura e memória de pH ótimos, estabilidade em temperaturas altas (35°C, 45°C e 60°C), baixas (4°C e -10°C) e ambiente, bem como a especificidade em diferentes ácidos graxos e diferentes alcoóis.

A produção de enzimas por FES utilizando levedura, aliada ao aproveitamento de resíduos, geração de produtos de alto valor agregado e a lacuna encontrada na literatura em relação à produção e caracterização de lipases produzidas por micro-organismos isolados e pré-selecionados, justificam plenamente este trabalho, considerando o aumento dos volumes de resíduos agroindustriais gerados nas indústrias, associado à crescente preocupação com os impactos ambientais destes e uma legislação ambiental cada vez mais rígida.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ENZIMAS

As enzimas constituem um grupo de substâncias orgânicas de natureza normalmente protéica (existem também enzimas constituídas de RNA, as ribozimas), com atividade intra ou extracelular que têm funções catalisadoras, catalisando reações químicas que, sem a sua presença, dificilmente aconteceriam. Isso é conseguido através do abaixamento da energia de ativação necessária para que se dê uma reação química, resultando no aumento da velocidade da reação e possibilitando o metabolismo dos seres vivos. A capacidade catalítica das enzimas torna-as adequadas para aplicações industriais, como na indústria farmacêutica ou de alimentos.

Em sistemas vivos, a maioria das reações bioquímicas dá-se em vias metabólicas, que são sequências de reações em que o produto de uma reação é utilizado como reagente na reação seguinte. Diferentes enzimas catalisam diferentes passos de vias metabólicas, agindo de forma sincronizada de modo a não interromper o fluxo nessas vias. Cada enzima pode sofrer regulação da sua atividade, aumentando-a, diminuindo-a ou mesmo interrompendo-a, de modo a modular o fluxo da via metabólica em que se insere.

Além de serem muito ativas e versáteis, as enzimas são biocatalisadores altamente requisitados, devido às suas propriedades, executando uma série de transformações de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reação, o que as difere dos catalisadores não enzimáticos. A facilidade de regular a atividade enzimática é mais um ponto positivo na utilização de enzimas. Para isso basta apenas que se modifique a natureza do meio de reação, altere o pH ou adicione algum efector. Toda enzima ainda catalisa as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas, comuns em sínteses químicas, devido à sua especificidade (Patel, 2002; Pizarro e Park, 2003).

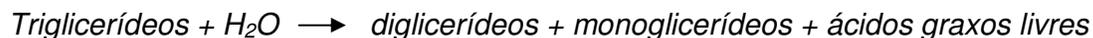
As enzimas industriais são em sua maioria obtidas de micro-organismos (Sharma *et al.*, 2001). As enzimas microbianas são normalmente mais úteis que as enzimas derivadas de plantas e animais, devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, aos altos rendimentos possíveis, à facilidade de manipulação genética, ao fornecimento regular devido à ausência de flutuações sazonais e ao

rápido crescimento dos micro-organismos em meios de baixo custo. As enzimas microbianas são também mais estáveis e sua produção é mais conveniente e segura. Contudo, apenas cerca de 2% dos micro-organismos existentes foram testados como produtores de enzimas (Hasan *et al.*, 2006).

2.2 LIPASES: DEFINIÇÃO

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) constituem um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos livres na interface lipídio-água (Treichel *et al.*, 2010, Rajendran e Thangavelu, 2009), em sistemas biológicos (Rodrigues *et al.*, 2008). Sendo assim, as lipases catalisam a transesterificação de ésteres, bem como a síntese destes compostos, além de apresentarem propriedades enantiosseletivas. São também capazes de catalisar reações de lactonização (esterificação intramolecular), além de agirem sobre compostos que causam ranços (Levy *et al.*, 2003, Pastore *et al.*, 2003). A capacidade de lipases para realizar transformações químicas muito específicas (biotransformações) tornou-as interessantes em alimentos, detergentes, sínteses, cosméticos orgânicos, produtos farmacêuticos e industriais (Treichel *et al.*, 2010 e Rodrigues *et al.*, 2008).

De acordo com a União Internacional de Bioquímica (IUB), a lipase catalisa a seguinte reação:



As lipases ainda têm sido pouco empregadas industrialmente, embora sejam estudadas há anos e possam ser produzidas em larga escala. Pesquisas têm sido realizadas com o intuito de otimizar os processos de modificação de óleos e gorduras catalisados por lipases. Tais pesquisas incluem estudos cinéticos, desenvolvimento de biorreatores e imobilização de enzimas (Carvalho *et al.*, 2003).

Estes catalisadores tornaram-se parte integrante da indústria alimentar moderna, e um grande número de lipases são produzidas em escala industrial para o desenvolvimento de aromas em produtos lácteos, processamento de alimentos,

como carnes, legumes, frutas, assados e cerveja (Treichel *et al.*, 2010, Rajendran e Thangavelu, 2009).

2.3 LIPASES MICROBIANAS

Lipases são produzidas por várias plantas, animais e micro-organismos. As últimas representam a classe mais utilizada de enzimas em aplicações biotecnológicas e química orgânica. Micro-organismos com potencial para produção de lipases tanto em fermentação submersa (FS) como em estado sólido (FES) têm sido relatados (Treichel *et al.*, 2010).

Aproximadamente cem anos atrás, o microbiologista C. Eijkmann reportou que diferentes cepas bacterianas poderiam produzir e secretar lipases (Jaeger e Eggert, 2002). Então, a partir de 1906, iniciaram-se os estudos sobre produção de lipases utilizando-se diversos micro-organismos como bactérias, fungos e leveduras (Hasan *et al.*, 2006).

As lipases microbianas têm recebido atenção especial devido às suas diversas propriedades, como relativa facilidade de preparação e ampla especificidade pelo substrato, estereosseletividade (Treichel *et al.*, 2010; Rajendran e Thangavelu, 2009) além de facilidade de produção em grandes quantidades (Hansan *et al.*, 2006). Uma revisão dos micro-organismos mais recentemente citados como produtores de lipase por FS e FES estão representados na Tabela 1.

Nas últimas décadas, o interesse na produção de lipases microbianas tem aumentado devido à versatilidade da estrutura molecular e propriedades catalíticas. Estas enzimas têm um amplo potencial de aplicação em diferentes setores industriais, conforme já citado anteriormente (Damaso *et al.*, 2008).

Na produção de alimentos (laticínios, peixe e produtos cárneos) e bebidas alcoólicas, os micro-organismos vêm desempenhando um papel importante. Além disso, vários produtos de fermentação microbiana também são incorporados em alimentos como aditivos e suplementos (antioxidantes, aromas, corantes, conservantes, edulcorantes e outros). Há grande interesse no desenvolvimento e utilização de alimentos naturais e aditivos derivados de micro-organismos, uma vez que são mais desejáveis do que os sintéticos produzidos por processos químicos. (Couto e Sanromán, 2006).

Tabela 2.1 Micro-organismos produtores de lipases e respectivas referências

Micro-organismo	Tipo	Referência	
		FS	FES
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Fungo	Rajendran <i>et al</i> (2009)	
<i>Candida cylindracea</i>	Levedura	D'Annibale (2006)	
			Martinez-Ruiz <i>et al</i> (2008)
<i>Rhizopus sp.</i>	Fungo		
<i>Pseudomonas sp.</i>	Bactéria	Cheirsilp <i>et al</i> (2009)	
<i>Yarrowia lipolytica (cepa mutante)</i>	Levedura	Fickers <i>et al</i> (2009)	
<i>Bacillus coagulans</i>	Bactéria		Alkan <i>et al</i> (2006)
<i>Rhizopus homothallicus</i>	Fungo		Rodriguez <i>et al</i> (2006)
<i>Aspergillus niger</i>	Fungo		Dutra <i>et al</i> (2008)
<i>R. oryzae</i>	Fungo	Kawakami <i>et al</i> (2009)	
<i>Candida antarctica</i>	Levedura	Vahl <i>et al</i> (2008)	
<i>Penicillium verrucosum</i>	Fungo		Kempka <i>et al</i> (2008)
<i>Aspergillus niger</i>	Fungo		Damaso (2008)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fungo		Martins <i>et al</i> (2008)
<i>Phialemonium sp.</i>	Fungo		Martins <i>et al</i> (2008)
<i>Mucor miehei</i>	Fungo	Shamel <i>et al</i> (2007)	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Levedura	Mingrui Yu (2007)	
<i>Aspergillus oryzae (geneticamente modificado)</i>	Fungo	Dizge <i>et al</i> (2009)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactéria		Gupta <i>et al</i> (2008)
<i>Candida antarctica</i>	Levedura	Rodrigues <i>et al</i> (2008)	
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Bactéria	Al-Zuhair <i>et al</i> (2009)	
<i>Candida antarctica</i>	Levedura	Al-Zuhair (2009)	
<i>Bacillus subtilis</i>	Bactéria	Takaç <i>et al</i> (2008).	
<i>Bacillus sp.</i>	Bactéria	Ertugrul <i>et al</i> (2007)	
<i>Rhizopus oryzae</i>	Fungo	Hama <i>et al</i> (2009)	
<i>Rhizopus chinensis</i>	Fungo	Sun & Xu (2009)	
<i>Rhizopus chinensis</i>	Fungo		Sun & Xu (2009)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Levedura	Destain <i>et al</i> (2008)	
<i>Candida cylindracea</i>	Levedura	Brozzoli <i>et al</i> (2009)	
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Fungo	Xie e Ning Ma (2009)	
		Teng <i>et al</i> (2009)	
<i>Rhizopus chinensis</i>	Fungo	Xu <i>et al</i> (2009)	
<i>Aureobasidium pullulans (isolada do mar)</i>	Levedura	Liu <i>et al</i> (2008)	
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Fungo		Vargas (2008)

2.3.1 Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares capazes de reproduzir-se assexuadamente através do brotamento das células e esporulação ou, mais raramente, por fissão celular. Assim, as leveduras possuem capacidade de

multiplicar-se rapidamente em ambientes líquidos, que favorecem a dispersão das células. Muitas leveduras crescem sob condições anaeróbias, o que também favorece o crescimento em líquidos (Pitt e Hocking, 1999).

Na metade do século passado ocorreu o primeiro registro de uma levedura (*Mycotorula lipolytica*) produtora de lipase (Peters e Nelson, 1948).

De acordo com Vakhlu e Kour (2006), as espécies de leveduras encontradas para a produção de lipases são: *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Candida antarctica*, *Candida cylindracea*, *Candida parapsilopsis*, *Candida deformante*, *Candida curvata*, *Candida valida*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula pilimornae*, *Pichia bispora*, *Pichia mexicana*, *Pichia sivicola*, *Pichia xylosa*, *Pichia burtonii*, *Saccharomyopsis crataegensis*, *Torulaspota globosa* e *Trichosporon asteroides* (Treichel *et al.*, 2010).

Enquanto as lipases de muitas espécies de fungos filamentosos e de bactérias são produzidas largamente em escala industrial, apenas a lipase da levedura *Candida rugosa* tem tido papel de destaque no cenário biotecnológico (Hadeball, 1991).

Tem sido demonstrado que as lipases produzidas pelo gênero *Candida* apresentam excelente capacidade de esterificação, sem demonstrar especificidade posicional para os triglicerídeos, além de apresentarem aplicação potencial para a catálise da síntese de ésteres de cadeia curta que podem ser usados tanto como compostos flavorizantes ou aromatizantes, bem como combustíveis na forma de biodiesel. Nesse último caso, como ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos (Nelson *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2003).

Apesar das lipases de *C. rugosa* e *C. antarctica* terem sido amplamente utilizados como biocatalisadores em diferentes áreas, existem publicações recentes relatando a produção de lipases por outras leveduras, em culturas submersas, como mostrado na Tabela 1. Para culturas com ausência de meio líquido, nenhum trabalho, utilizando levedura, encontra-se publicado. Assim, também ocorre com a nova cepa de levedura *Sporobolomyces ruberrimus*, utilizada para produção de lipases nesta pesquisa.

2.3.2 Fungos filamentosos

Alguns fungos produtores de lipases mais importantes comercialmente são reconhecidos como pertencentes aos gêneros *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp. e *Rhizomucor* sp. A produção de lipases por fungos filamentosos varia de acordo com a composição do meio, condições de cultivo, pH, temperatura, e do tipo de fonte de carbono e nitrogênio empregados.

A demanda industrial por novas fontes de lipases com diferentes características catalisadoras estimula o isolamento e seleção de novas cepas. Micro-organismos 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).

2.3.3 Bactérias

As lipases foram detectadas há mais de um século em bactérias, então agrupadas como parte do gênero *Bacillus* (*B. prodigiosus*, *B. pyocyaneus* e *B. fluorescens*) e hoje estão identificadas como *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*, respectivamente (Jaeger *et al.*, 1994).

A maioria das bactérias que têm sido empregadas para a produção de lipases e aquelas que têm sido empregadas na clonagem de genes não são patogênicas e, portanto, poderiam vir a ser aplicadas em algum processo biotecnológico. Entretanto, o emprego de lipases com alto grau de pureza, bem como o uso em transformação de substratos não naturais, tem propiciado o emprego de linhagens patogênicas.

As lipases de aplicações comerciais são predominantemente de origem fúngica. Talvez isso se explique pelo fato de que, culturalmente, a maioria das aplicações das lipases se dê na área de alimentos, na qual se empregam fungos considerados GRAS (“Generally Regarded As Safe”). Em decorrência do aumento do uso de lipases em outras áreas, entretanto, tem aumentado o emprego das lipases bacterianas em processos biotecnológicos, mesmo sendo originária de um patógeno. Atualmente sabe-se que diversas espécies bacterianas são produtoras de lipases, sendo as mais importantes do ponto de vista industrial bactérias dos gêneros *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*,

Alcaligenes e *Pseudomonas*, sobressaindo-se esta última (Watanabe *et al.*, 1977; Jaeger *et al.*, 1994; Rathi *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2004; Vargas *et al.*, 2004).

Em geral as lipases são produzidas pelas bactérias como consequência do crescimento delas em meios de cultura que contêm lipídio com fonte de carbono (óleos vegetais, ácidos graxos, glicerol ou tensoativos como o Tween) e uma fonte orgânica de nitrogênio (Li *et al.* 2004; Li *et al.*, 2005). Apesar de as lipases bacterianas poderem atuar em ampla faixa de pH e temperatura, elas agem, preferencialmente, em condições alcalinas (Gupta *et al.*, 2004; Dominguez *et al.*, 2005).

2.4 APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DAS LIPASES

Em meio orgânico, as mudanças de comportamento enzimático da enzima pode ser utilizadas para a síntese de lipídios diferentes. A versatilidade dessas enzimas leva a várias aplicações industriais, na área de alimentos, produtos farmacêuticos, síntese de ésteres de carboidratos, amins e amidas, cosméticos, entre outros (Rodrigues *et al.*, 2008).

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

O desenvolvimento dos processos de fermentação durante a última parte do século XX propiciou a produção de enzimas através do uso de cepas selecionadas e tornou possível a obtenção de enzimas purificadas e bem caracterizadas, mesmo

em escala industrial. A produção em larga escala permitiu a introdução de enzimas em vários segmentos industriais.

Novas tecnologias como a recombinação gênica, a engenharia de proteínas e a evolução dirigida propiciaram a obtenção de enzimas com características (atividade, estabilidade, seletividade, especificidade) novas e mais dirigidas a substratos e condições de interesse industrial, promovendo a expansão da aplicação de enzimas. Entre as maiores empresas produtoras de enzimas estão a Amano Pharmaceuticals (Japão), Novozymes (Dinamarca), Genencor International (USA), Unilever (Holanda), Biocatalysts (Inglaterra) e Meito Sankyo (Japão) (Krishna, 2002).

2.5 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Existem dois tipos básicos de fermentação para produção de enzimas e outros metabólitos: fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES), como observado na Figura 1. Na FES, o micro-organismo cresce em substratos sólidos umedecidos ou suportes inertes, na ausência de água livre, e na FS, os substratos são dissolvidos em meio líquido.



Figura 1. Representação do processo de produção de enzimas por fermentação em estado sólido (a) e fermentação submersa (b). (Fonte: Registro feito durante experimentos).

Embora a FS seja ainda a mais utilizada, como observado na Figura 2, existe uma tendência no crescimento na FES, devido aos resíduos industriais, além da

credibilidade adquirida nos últimos anos na indústria biotecnológica a partir de melhor compreensão de aspectos de Engenharia Bioquímica como modelagem matemática e design de biorreatores, proporcionando o escalonamento com tecnologia economicamente viável (Soccol e Pandey, 2008).

A fermentação em estado sólido pode ser definida como o processo que envolve sólidos, em ausência ou quase ausência de água livre. Contudo, o substrato deve possuir umidade suficiente para dar suporte ao crescimento e sustentabilidade ao metabolismo do micro-organismo (Germano, 2000; Pandey, 2003). Este tipo de processo fermentativo tem recebido atenção especial, devido à grande quantidade de enzimas extracelulares produzidas durante o processo, dentre outros metabólitos (Sato e Sudo, 1999).

A fermentação em estado sólido é uma tecnologia adequada à produção de enzimas, uma vez que este processo pode ser realizado *in situ* e rejeitos industriais podem ser empregados como fonte de nutrientes para o processo fermentativo (Martins *et al.*, 2008).

A FES se assemelha ao habitat natural dos micro-organismos e, portanto podem conduzir a obtenção de produtos de alto valor agregado. A FS pode ser considerada como uma violação ao habitat natural do micro-organismo, nem tanto de leveduras e bactérias, mas especialmente de fungos. Nem mesmo micro-organismos marinhos preferem nadar em água livre, sendo que mais de 98% dos isolados de ambiente marinho foram obtidos a partir de substratos sólidos de superfícies submarinas. A FES reproduz processos microbiológicos naturais como compostagem e ensilagem. Em processos de FES, por sua vez, a utilização de resíduos agrícolas é viável economicamente devido aos baixos custos e por outro lado, pode vir a contribuir com os problemas de poluição relacionados à sua inadequada eliminação (Singhania *et al.*, 2008). Além disso, pesquisas com fermentação em estado sólido têm apresentado maiores produções de lipases, quando comparada com a fermentação submersa. E esta vantagem tem sido atribuída à alta taxa de crescimento da biomassa e à baixa atividade proteolítica (Martins *et al.*, 2008).

Todos os processos de fermentação usados nos tempos antigos foram baseados em princípios de tecnologia de fermentação em estado sólido. Relatos históricos indicam que foi perdido no esquecimento, nos países do oeste após 1940,

devido à emergência de tecnologia relacionada à fermentação submersa. Talvez a FES tenha sido negligenciada, porque o desenvolvimento da penicilina, conhecida como droga milagrosa, ocorreu em fermentação submersa (FS), que estava tendo uma enorme importância na época.

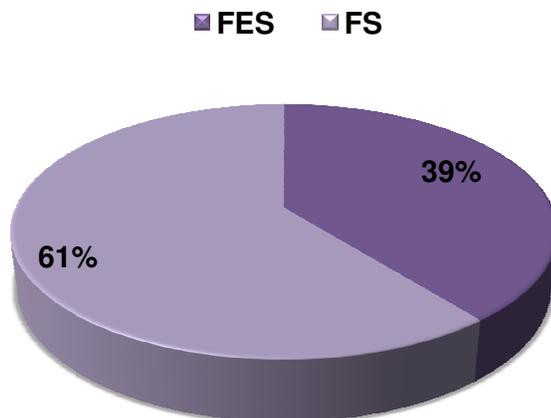


Figura 2. Gráfico demonstrativo para os percentuais de utilização dos processos de fermentação em estado sólido e fermentação submersa (Fonte: Revisão de artigos relativos à área, entre 2006 e 2010).

As pesquisas relacionadas à FES sempre continuaram, embora em áreas isoladas. Durante 1950-1960, foi relatada a transformação de esteróides em culturas de fungos. Relatos da produção de micotoxinas empregando FES apareceram durante 1960-1970, o que permitiu atingir outro marco para FES. A utilização deste processo teve continuidade na indústria alimentícia utilizando resíduos agroindustriais, oferecendo assim um processo único de desenvolvimento para a adição de valor a estes resíduos de baixo custo que também são considerados poluentes em certa medida.

Houve um aumento na utilização do processo de FES, para o desenvolvimento de processos biológicos, tais como a biorremediação e biodegradação de compostos perigosos, desintoxicação biológica de resíduos

agroindustriais, biotransformação de culturas e enriquecimento nutricional de resíduos para culturas, obtenção de produtos de alto valor agregado, tais como metabólitos secundários biologicamente ativos, incluindo antibióticos, alcalóides, fatores de crescimento da planta, enzimas, ácidos orgânicos, biopesticidas, incluindo micopesticidas e bioerbicidas, biosurfactantes, biocombustíveis, compostos aromáticos (Pandey, 2003).

Assim, embora historicamente conhecida desde séculos, a FES ganhou uma nova atenção de pesquisadores e indústrias em todo o mundo, recentemente, principalmente devido a algumas vantagens que oferece comparada à fermentação submersa, especialmente nas áreas de gestão de resíduos sólidos, conservação de energia e biomassa e seus aplicativos para produzir produtos de elevado valor, além da produção de alimentos, rações, combustíveis e produtos químicos tradicionais a granel (Pandey *et al.*, 2007).

A capacidade de manipulação genética de linhagens de fungos alargou horizontes para a FES permitindo tecnologia apropriada para a produção de proteínas recombinantes e produtos químicos de alto valor agregado.

Existem vários fatores importantes que produzem imenso impacto sobre o sucesso de uma determinada tecnologia, portanto, necessária para o desenvolvimento de qualquer bioprocessos. Dentre estes fatores pode-se citar a seleção de micro-organismos e substratos, otimização dos parâmetros do processo e também a purificação do produto final, que tem sido um desafio para esta tecnologia. Fungos e leveduras foram denominados como micro-organismos adequados para a FES de acordo com o conceito teórico de atividade de água, tem sido, com base neste mesmo conceito, as bactérias consideradas inadequadas.

Ainda assim, a disponibilidade de vários artigos de pesquisa mostra que as culturas bacterianas também podem ser bem manipuladas e gerenciadas em processos de FES, apesar de não serem bons produtores teóricos de enzimas (Gupta *et al.*, 2008; Chinn *et al.*, 2007; Sabu *et al.*, 2006). Como exemplo, a produção de *Bacillus thuringiensis* foi otimizada por FES utilizando farelo de trigo como substrato visando à obtenção da máxima quantidade de toxina e observou-se um favorável custo-benefício (Devi *et al.*, 2005).

O estabelecimento das relações entre a fisiologia dos micro-organismos e os fatores físico-químicos é o objetivo para o desenvolvimento de modelos adequados.

Esses fatores incluem temperatura, pH, aeração, atividade de água e umidade, as propriedades do meio, natureza do substrato sólido empregado. Entre vários fatores, pode-se citar umidade e a natureza do substrato sólido empregados são os mais importantes fatores que influenciam os processos de FES. A definição da umidade depende do micro-organismo utilizado, e também da natureza do substrato. Fungos necessitam menor umidade, 40-60% de umidade pode ser suficiente, mas a seleção do substrato depende de vários fatores principalmente relacionados com o custo e disponibilidade e, portanto, pode envolver a triagem de resíduos agroindustriais diversos (Singhania *et al.*, 2008).

2.5.1 Características da fermentação em estado sólido

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

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

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

No que diz respeito aos efeitos macroscópicos, a presença ou não da água afeta significativamente a taxa de crescimento radial, a evolução da germinação, esporulação e atividade metabólica das colônias, uma vez que se a quantidade de

água não for suficiente para manter as propriedades funcionais de algumas enzimas, a perda de atividade enzimática pode levar ao desequilíbrio na cadeia metabólica das células (Gervais e Molin, 2003). Assim, o controle deste parâmetro pode ser usado para modificar a produção metabólica ou excreção de um micro-organismo (Pandey, 2003).

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

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

Na formulação do meio de fermentação várias fontes de carbono (substrato principal) são utilizadas, entre elas cita-se (Alonso, 2001): farelo de trigo (Silva *et al.*, 2000; Ellaiah *et al.*, 2004), farelo de arroz (Ellaiah *et al.*, 2004), farelo de cevada (Dominguez *et al.*, 2003), bagaço de cana-de-açúcar (Cordova *et al.*, 1998; Ellaiah *et al.*, 2004), torta de côco (Benjamin e Pandey, 2000), torta de soja (Vargas, 2004), torta de babaçu e farelo de mamona (Silva, 2010), 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: licor de milho, extrato de levedura, uréia, sais de amônio e outros. Sais metálicos e micro-elementos podem ser suplementados para suprir as necessidades do micro-organismo (Alonso, 2001).

Enzimas hidrolíticas extracelulares e outros metabólitos são em muitos casos produzidas em grandes quantidades em fermentações em estado sólido. As enzimas extracelulares são secretadas pelas hifas a fim de permitir a absorção de nutrientes de peso molecular pelas células (Sato e Sudo, 1999).

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

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

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

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

f) A aeração do meio é facilitada devido ao maior espaço entre as partículas e pela difusão do oxigênio na água utilizada para umidificar o meio;

g) Altos rendimentos quanto à formação de metabólitos, e simplicidade nas etapas de purificação, pois os produtos estarão concentrados no líquido da extração.

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

Em processos de FES outro problema encontrado está na difícil remoção do calor produzido devido à atividade metabólica microbiana e dificuldade de controle dos parâmetros da fermentação, principalmente em processos em grande escala. Este problema se deve em grande parte à dificuldade de homogeneização do meio reacional, além dos problemas difusionais característicos de processos envolvendo meios sólidos (Pandey e Soccol, 2001; Sato e Sudo, 1999; Palma *et al.*, 2000; Germano, 2000; Bianchi *et al.*, 2001; Von Meien e Mitchell, 2002; Mitchell *et al.*, 2003).

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

2.6 IMPORTÂNCIA INDUSTRIAL DE ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS

Os ésteres são importantes compostos orgânicos com um número crescente de aplicações comercial. Estes compostos são amplamente utilizados para a preparação de compostos aromáticos, cosméticos, detergentes, sabores e produtos farmacêuticos. Os ésteres também podem ser utilizados como plastificantes e lubrificantes. O oleato de etila é utilizado, por exemplo, como aditivo biológico, plastificante e fluido hidráulico. Os ésteres obtidos a partir de fontes naturais não

estão disponíveis em grandes quantidades, e são normalmente demasiado caro para serem utilizados em aplicações comerciais.

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

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

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. Já os produtos de esterificação de ácidos carboxílicos de cadeia longa (12-20 átomos de carbono) com álcoois de cadeia longa são utilizados como lubrificantes e plastificantes em máquinas de alta precisão. 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). Os ésteres de sacarose, por exemplo, são conhecidos como bons emulsificantes no campo da indústria alimentar, farmacêutica e cosmética; o palmitato de *isopropila* é usado em preparações medicinais para cosméticos, nas quais é necessária uma boa absorção do produto através da pele. Os ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, como os oleatos, palmitatos e linolenatos são os principais constituintes do biodiesel (Hazarika *et al.*, 2002).

2.7 CARACTERIZAÇÃO DE LIPASES

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

2.7.1 Especificidade pelo substrato

Para a aplicação das lipases com propósitos analíticos ou industriais a especificidade é extremamente importante (Castro e Anderson, 1995). A especificidade ao substrato vem sendo intensamente investigada em sistemas reacionais bifásicos e meios reacionais orgânicos. Modelos cinéticos usualmente baseados na aplicação das suposições de Michaelis-Menten foram propostos, como aqueles que empregam um fator de competição para expressar a especificidade ao substrato (Peter e Preda, 2002).

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). Dependendo das características de especificidade da lipase, esta pode se tornar atraente para diferentes aplicações em áreas industriais potenciais (Sun e Xu, 2009).

As lipases são capazes de catalisar reações com uma ampla faixa de substratos, mas as taxas de reação variam amplamente com a estrutura das

moléculas do substrato. As diferentes afinidades de uma molécula de lipase por diferentes álcoois e ácidos graxos pode ser entendida em termos da energia de ligação que é liberada quando um substrato se liga ao sítio ativo das lipases. Poucos dos muitos substratos que se ligam ao sítio ativo podem liberar uma quantidade suficiente de energia de ligação para ocasionar uma mudança na conformação da lipase para uma forma mais eficiente cataliticamente (Abbas e Comeau, 2003). A especificidade das lipases é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação enzima-substrato (hidratação estérica e interações hidrofóbicas) (Rigo, 2009).

2.7.2 Estabilidade térmica

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

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

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

processos covalentes envolvidos na inativação irreversível de proteínas como a desaminação, hidrólise peptídica e decomposição da cistina requerem água. Esses processos irreversíveis são também extremamente lentos em baixos teores de água (Gupta, 1992).

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

2.7.3 Efeitos de temperatura e memória de pH

Outra consequência importante da rigidez conformacional das moléculas de enzima contidas nos extratos enzimáticos liofilizados é a memória de pH. Quando 'transferida' da água para solventes orgânicos, a 'conformação' da enzima no meio aquoso é mantida. Dessa forma, a conformação da enzima em diferentes pHs no meio aquoso é mantida após a liofilização (Gupta, 1992). A atividade enzimática em solventes orgânicos é criticamente dependente do pH da solução aquosa antes da liofilização, porque a memória de pH é atribuída a uma fixação das ionizações dos grupos protéicos catalíticos após a secagem da preparação biocatalítica (Sun e Xu, 2009).

Muitos resultados são apresentados na literatura em relação às faixas de atuação de lipases em função do pH e da temperatura. Contudo, a comparação destes resultados torna-se difícil, já que o comportamento da enzima pode variar de acordo com os métodos fermentativos, meios e micro-organismos empregados, bem como diferentes sistemas e grau de purificação (Rigo, 2009). O comportamento da enzima normalmente é avaliado em valores de pH em torno da neutralidade, mas também em valores fortemente ácidos (pH 2,0) a fortemente alcalinos (pH 12,0); e temperaturas em torno da média (30-40°C), mas variando entre 20 e 100°C.

Poucas referências existem atualmente na literatura em relação à avaliação do comportamento de lipases com atividade de síntese frente a diferentes temperaturas e memórias de pH. Dentre as referências utilizadas na discussão desse trabalho, podem-se citar os trabalhos desenvolvidos por Sun e Xu (2009).

2.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A revisão da literatura apresentada permitiu concluir que as lipases de origem microbiana apresentam um grande potencial de aplicações biotecnológicas. Até a presente data as lipases de levedura de *Candida rugosa* e *Candida antarctica* são as principais fontes de muitas lipases disponíveis comercialmente e têm sido amplamente utilizadas em diferentes áreas. Ao mesmo tempo, a demanda contínua por enzimas altamente ativas com propriedades apropriadas encoraja a pesquisa por novas fontes de enzimas. Publicações recentes relatam a produção de lipases por outras leveduras.

Sendo assim, é de grande importância a realização de estudos sobre condições apropriadas de produção de lipases a partir de micro-organismos isolados e pré-selecionados, incluindo o estudo da sua produção em meios de baixo custo, como os resíduos agroindustriais. Portanto, o estudo da otimização para a máxima produção de lipases microbianas a partir de novas cepas microbianas e com a utilização de resíduos agroindustriais é de grande valia.

As características bioquímicas das lipases produzidas, como temperatura de atuação e as faixas de pH, as estabilidades quando submetidas à altas temperaturas ou armazenadas em baixas temperaturas ou temperatura ambiente e a especificidade aos substratos reacionais são de extrema importância para determinar suas possíveis aplicações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da Universidade do Alto Uruguai e das Missões URI-Campus de Erechim. Neste capítulo, são descritos os principais materiais e metodologias utilizadas para desenvolver a pesquisa relacionada à produção de lipases extracelulares por fermentação em estado sólido (FES) utilizando resíduos agroindustriais como substratos e a levedura *Sporobolomyces ruberrimus*.

3.1 MATERIAIS

Os principais reagentes utilizados:

- a) Acetona (Quimex);
- b) Ácido bórico (Nuclear);
- c) Ácido sulfúrico concentrado (Quimex);
- d) Bagaço de cana (destilaria local);
- e) Biftalato de Potássio (Nuclear);
- f) Butanol seco (máx. 0,005% H₂O) (Merck);
- g) Etanol 95% (Quimex);
- h) Farelo de arroz (Josapar, Pelotas, RS);
- i) Farelo de soja (Olfar, Erechim, RS);
- j) Fenolftaleína (Nuclear);
- k) Fosfato de sódio (Vetec);
- l) Hidróxido de sódio (Nuclear);
- m) Meio PDA (Batata, Dextrose, Agar) (Acumedia);
- n) Metanol seco (máx. 0,005% H₂O) (Merck);
- o) *n*-propanol (Vetec);
- p) Pastilha catalisadora (sulfato de potássio e selênio) (Velp Científica).

3.2 EQUIPAMENTOS

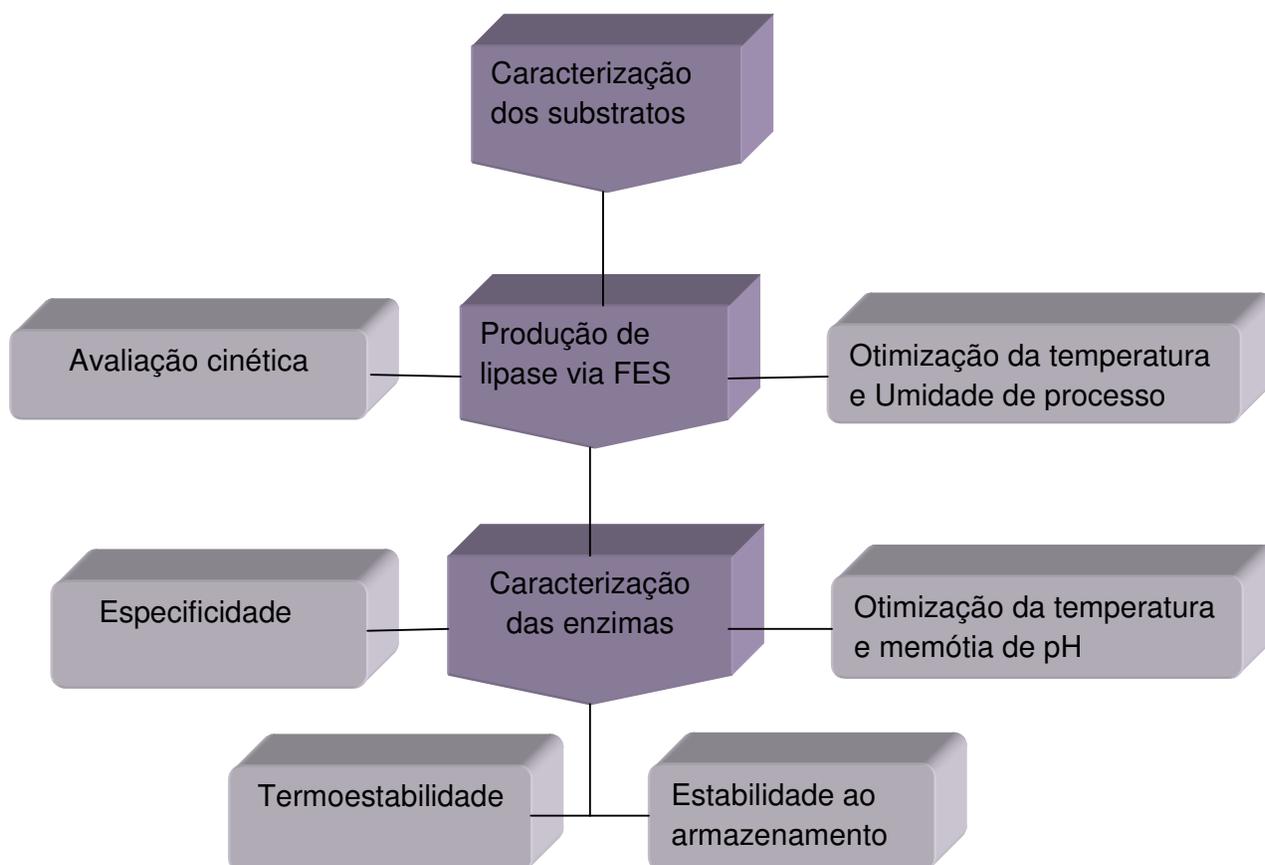
Os principais equipamentos utilizados foram:

- a) Agitador orbital (Marconi MA-410);
- b) Agitador magnético (Fisatom);

- c) Balança analítica (Bel Engineering);
- d) Câmara de fluxo laminar (Pachane);
- e) Dessecador com sílica (Vidralabor, Thermex);
- f) Destilador Kjeldahl (Marconi, modelo MA036);
- g) Extrator de Soxhlet (Marconi, modelo MA491);
- h) Espectrofotômetro (Agilent Technologies 8453);
- i) Estufa com circulação de ar (Fanem, modelo 320SE);
- j) Freezer -80°C (Hitachi);
- k) Germinadora para incubação (Tecnal TE-401);
- l) Liofilizador (Edwards Modulyo);
- m) Micro-ondas Philco (modelo PMW 110);
- n) Medidor de pH digital (Gehaka, modelo PG2000);
- o) Titulador automático (Mettler Toledo DL 50 Graphix).

3.3 MÉTODOS

De forma sucinta, estão apresentadas no fluxograma abaixo, as etapas realizadas visando o estudo da produção da lipase com atividade de esterificação.



3.4 MICRO-ORGANISMO

O micro-organismo *Sporobolomyces ruberrimus*, isolado por Griebeler *et al.* (2009), a partir de farelo de soja, como um potencial produtor de lipases e identificado no Laboratório de Biologia Molecular e Celular do CENA-USP-Piracicaba foi utilizado neste trabalho.

3.5 MANUTENÇÃO DAS CEPAS

Para a manutenção da levedura, esta foi inoculada em meio PC (% m/v) em água destilada: 0,5% de peptona; 0,1% de dextrose; 0,25% de extrato de levedura e incubada a 30°C por 24 h, sendo o meio adicionado em microtubos estéreis de 1,5 mL com glicerol na proporção 1:1. Os tubos foram mantidos em freezer a -18°C. A levedura também foi conservada em tubos com PDA inclinado com camada de óleo mineral sob refrigeração. Foram realizados repiques semanais em placas de Petri contendo meio PDA incubando-se a 30°C por 3 a 5 dias; sendo as placas armazenadas sob refrigeração por até uma semana após a incubação.

3.6 PRODUÇÃO DE INÓCULO

Utilizou-se o meio PC descrito previamente para a produção do inóculo. O pré-inóculo foi preparado adicionando o micro-organismo das placas em tubos de ensaio com tampa contendo 10 mL de meio PC previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos. A mistura foi incubada a 25°C por 24 horas.

O inóculo foi preparado pela adição do pré-inóculo em erlenmeyer de 250 mL, tampado com bucha de algodão contendo 90 mL de meio PC previamente esterilizado. Os frascos foram incubados em agitador orbital (Marconi MA410) a 30°C e 150 rpm por 24 horas. Esse caldo (inóculo) foi utilizado para a inoculação do meio fermentativo e ajuste da umidade (concentração média de 0,3 g/L de massa celular seca).

3.7 SUBSTRATOS

Os substratos utilizados como suporte no processo fermentativo para a produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES) foram: farelo de soja (FS), que consiste no resíduo da extração do óleo de soja, obtido após a prensagem de grãos e extração com solventes, doado por uma indústria de óleo de soja local

(Olfar, Erechim, RS), o bagaço de cana de açúcar (BC), um dos subprodutos da indústria da cana (doado por uma destilaria local) e o farelo de arroz (FA), que é um subproduto do processo de beneficiamento do arroz, obtido em uma indústria de parboilização de arroz (Josapar Pelotas, RS). Ambos os substratos foram estocados a -15°C e foram utilizados como recebidos, sem tratamento prévio.

A caracterização dos farelos foi realizada determinando-se a umidade, cinzas, lipídios, nitrogênio (NKT), proteínas, minerais e pH, seguindo metodologia descrita a seguir. A análise da umidade antecedia cada etapa experimental de fermentação buscando a padronização deste conteúdo no meio.

3.8 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS

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

3.8.1 Umidade

Foi pesado 3g da amostra em cápsula de alumínio, previamente seca em estufa a 105°C, até massa constante. O material contendo a amostra foi aquecido em estufa 105°C por 3h, resfriado e pesado; repetindo-se a operação de aquecimento, com duração de meia hora, até obtenção de massa constante. O teor de umidade foi determinado através da Equação 1 e as análises foram realizadas em triplicata.

$$U = \frac{(A_1 - A_2) \times 100}{B} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

U= Umidade (%);

A₁= Massa (inicial) cadinho vazio seco + amostra (g);

A₂= Massa do conjunto (final) amostra + cadinho (g);

B= Massa da amostra (g);

3.8.2 Cinzas

Foi pesado 3g da amostra em cápsula de porcelana, previamente seca em estufa a 105°C, até massa constante. O método fundamenta-se na perda de peso que ocorre quando a cápsula como o produto é incubado a 500-550°C, com a

destruição da matéria orgânica, sem decomposição dos constituintes do resíduo mineral ou perda por volatilização (Lanara, 1981). As análises foram realizadas em triplicata e a obtenção do teor de cinzas ocorreu de acordo com:

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{[(\text{Massa cadinho} + \text{amostra final (g)}) - \text{Massa cadinho inicial (g)}] \times 100}{\text{Massa Amostra inicial (g)}}$$

Equação 2

3.8.3 Lipídios

O teor de óleos e graxas dos farelos foi determinado por extração em Soxhlet pelo princípio da extração contínua a quente, utilizando éter petróleo como solvente. O papel de filtro contendo 3g de amostra foi empacotado e colocado em cartucho de extração previamente seco em estufa a 105°C por 15min. O cartucho foi colocado no extrator e iniciava-se a extração com éter petróleo por 6h em sistema de extração repetida. O solvente foi recuperado e o balão contendo as gorduras extraídas foi seco em estufa a 105°C por 1,5h, resfriado em dessecador até temperatura ambiente e, então, pesado. O teor de óleos e graxas foi calculado através da Equação 3.

$$AGT = \frac{(B - A) \times 100}{C}$$

Equação 3

Onde:

AGT=Lipídios Totais (%);

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

A= Massa do balão vazio seco (g);

C= Massa da amostra (g).

3.8.4 Nitrogênio

A determinação do teor de Nitrogênio Kjeldahl Total (NKT) foi feita por método padrão (IAL, 1985). A amostra (1g) foi digerida em meio ácido (12mL de H₂SO₄ concentrado) na presença de 1 pastilha de 3,5g de sulfato de potássio e 3,5

g de selênio durante 4h. Após neutralização com 40mL de NaOH (40%*m/v*), 75 mL de água destilada foram adicionados. A amônia formada foi destilada e absorvida em 25mL de ácido bórico (4%*m/v*) sendo, em seguida, titulada com HCl 0,1M. As análises foram realizadas em triplicata e a concentração de nitrogênio foi determinada através da Equação 4, sendo que para obtenção do o teor de proteína é necessário multiplicar o valor de NKT encontrado pelo fator 6,25.

$$NKT = \frac{14,01 \times Va \times N}{P \times 10} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

NKT= (%) Nitrogênio Kjeldahl total;

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

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

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

3.8.5 Proteínas

Para obtenção do o teor de proteína é necessário multiplicar o valor de NKT encontrado pelo fator de correção 6,25, como demonstrado pela Equação 5.

$$Pr\ oteína = NKT \times 6,25 \quad \text{Equação 5}$$

3.8.6 Minerais

A partir da obtenção apenas dos constituintes do resíduo mineral (cinzas) dos respectivos substratos caracterizados, foi possível determinar os macro e micronutrientes presentes nos mesmos.

Macronutrientes (Al, Mg, Ca e K) e micronutriente (Fe) foram determinados por espectrometria de absorção atômica em chama – FAAS (Varian Spectra AA – 55), segunda metodologia descrita por AOAC (1995). Foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco de Ca, Al, Mg, K e Fe, como fonte de radiação. Os elementos foram medidos em condições de operação otimizadas por FAAS em chama ar/acetileno ou óxido nitroso/acetileno. As leituras de Ca, Mg, Al, K e Fe foram realizadas no FAAS, no modo absorção. Para eliminar possíveis interferências na determinação de Ca, Mg e Al, foi adicionado cloreto de lantânio (Merck) nas amostras e nas soluções

padrão na proporção de 1% (m/v). Os cálculos dos teores dos minerais nas amostras foram baseados em curva de calibração obtida com as soluções padrão.

3.8.7 Determinação do pH

Para a determinação do pH dos substratos, foram pesados 10 gramas das amostras, todas em triplicata. Transferiu-se este conteúdo para erlenmeyer, onde 100mL de água destilada foram adicionadas. Agitou-se por 15 minutos a 160rpm e 25°C para homogeneização das partículas à água e após 10 minutos de repouso as mesmas foram filtradas e o pH foi determinado com medidor digital.

3.9 PRODUÇÃO DE LIPASES

Neste item será apresentada a metodologia utilizada para a produção de lipases utilizando resíduos agroindustriais por fermentação em estado sólido.

3.9.1.1 Fermentação em estado sólido (FES)

O micro-organismo foi inoculado, baseando-se nas condições estabelecidas por Vargas *et al.* (2008). Após a fermentação avaliou-se a atividade de esterificação no extrato bruto liofilizado.

Os substratos, sem tratamento prévio, foram utilizados nas fermentações conduzidas por 120h em béqueres de polipropileno de 600 mL tampados com manta acrílica hidrofóbica contendo 10 g de farelo seco com umidade ajustada. Após esterilização (121 °C, 15 min) os béqueres foram inoculados e incubados em câmara climatizada (Tecnal TE-410). Para a inoculação da levedura no meio fermentativo fez-se o ajuste da umidade em forma de inóculo levando em consideração a umidade natural de cada substrato.

3.9.1.2 Cinética da produção de lipase

Previamente à otimização, foi conduzido um ensaio cinético utilizando os substratos estudados. A atividade lipásica para cada substrato (farelo de soja, bagaço de cana e farelo de arroz), foi monitorada ao longo de 120 horas de fermentação à 27°C. A fermentação realizou-se em duplicata, com béqueres

contendo 10 g dos respectivos substratos, com umidade ajustada para 55% (em forma de inóculo) e a medida de atividade ocorreu em 24, 48, 72, 96 e 120 horas.

3.9.1.3 Otimização da produção de lipase

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios preliminares, a otimização da produção de lipase por *S. ruberrimus* foi realizada em 48 horas de fermentação para farelo de soja e farelo de arroz e em 72 horas de fermentação para bagaço de cana. A umidade e temperatura da fermentação foram avaliadas como fatores e a atividade lipásica do extrato enzimático liofilizado, como resposta. Para que as condições de produção de lipases pela levedura fossem otimizadas, utilizou-se a técnica de planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta.

A técnica de planejamento de experimentos é uma ferramenta estatística que permite determinar os fatores que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo, assim como avaliar as possíveis inter-relações entre as variáveis de um processo. Além disso, permite otimizar o sistema em estudo, com o objetivo de maximizar ou minimizar uma determinada resposta (Rodrigues *et al.*, 2005).

Após testes preliminares, três delineamentos compostos centrais rotacionais 2^2 (DCCR), um para cada substrato, foram realizados variando a umidade, ajustada através da concentração de inóculo (50, 60 e 70 %), do meio fermentativo e a temperatura de incubação em câmara climatizada (20 °C, 30 °C e 40 °C). A Tabela 2 apresenta as variáveis e a faixa de estudo para os delineamentos experimentais realizados. Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata e a resposta avaliada em todos os experimentos foi à atividade lipásica (conforme metodologia descrita posteriormente) e os resultados foram avaliados por meio do software Statística 6.0 (StatSoft, Inc., 2001).

Tabela 2. Níveis dos fatores investigados nos planejamentos experimentais.

Níveis	Umidade (%)	Temperatura (°C)
-1,41	46	16
-1	50	20
0	60	30
1	70	40
1,41	74	44

3.9.2 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

3.9.2.1 Processo de extração da enzima

O processo de extração foi realizado em erlenmeyers de 250 mL, onde ao meio fermentado era adicionado tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 na razão 1:4 (10 g de farelo fermentado para 40 mL de tampão). Estes frascos foram incubados por 30 min a 35 °C e 150 rpm em agitador orbital. Após a incubação, as amostras foram filtradas, utilizando-se tecido de nylon e pressão manual obtendo-se o extrato enzimático bruto (Vargas *et al.*, 2008).

Todas as determinações foram realizadas em duplicata. Cabe ressaltar que a determinação da atividade de esterificação deve ocorrer em sistema com baixo conteúdo de umidade. Assim, foi necessário realizar a desidratação do extrato aquoso obtido após o processo de extração da enzima da matriz sólida. Para tanto, foi empregado o processo de liofilização.

Os extratos foram dispostos em camadas de um centímetro de espessura em placas de Petri e então submetidas ao congelamento a -80 °C por no mínimo 24 h, como fase preparatória do procedimento de liofilização (Persson *et al.*, 2002). As amostras foram então levadas ao liofilizador, por cerca 48 horas até peso constante, onde através do processo de sublimação em condições de vácuo, a água livre presente no congelado foi removida.

3.9.2.2 Determinação da atividade de esterificação

Para a dosagem da atividade lipásica foi empregada a metodologia proposta por Rigo (2009), utilizando-se ácido oléico (Sigma-Aldrich) e etanol (Merck) como substratos para a reação de esterificação. A uma massa de 0,1 g de enzima

liofilizada foram adicionados os substratos reacionais na proporção molar de 1:2 e a mistura foi incubada por 40 minutos a 40 °C sob agitação de 150 rpm. Após a incubação, foram retiradas alíquotas (triplicata) de 300 µL e a reação foi interrompida pela adição de 20 mL de uma solução de acetona/etanol 1:1 (v/v). Os ácidos graxos não consumidos na reação foram titulados até pH 11,0 com uma solução de NaOH 0,02N. Os brancos reacionais foram preparados retirando-se alíquotas (triplicata) de 300µL previamente à incubação e interrompendo-se a reação com 20mL da solução de acetona/etanol 1:1 (v/v). Os brancos foram também titulados até pH 11,0 com solução de NaOH 0,02N. As dosagens de atividade foram feitas em triplicata para cada amostra liofilizada. Os resultados apresentados no decorrer deste trabalho referem-se à média dos valores obtidos. Uma unidade de atividade lipásica foi definida como a quantidade de enzima necessária para consumir 1µmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas, determinada por meio da Equação 6.

$$AL(U / g) = \frac{(V_b - V_a).N.1000.V_t}{t.Val.m} \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

V_a = volume de NaOH gasto na titulação da amostra;

V_b = volume de NaOH gasto na titulação do branco;

N = Normalidade da solução de NaOH padronizada;

V_t = Volume reacional total (5,6mL);

t = tempo de reação (40min);

V_{al} = volume de alíquota (0,3mL);

m = massa de extrato liofilizado (\cong 0,1 g)

3.9.2.3 Crescimento microbiano

O crescimento microbiano foi determinado em termos de concentração de biomassa (g/L). Foram adicionados 1 mL de caldo fermentado (triplicata) em tubos de polipropileno de 1,5 mL e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de água destilada e centrifugado novamente, sendo esse procedimento repetido duas vezes. A densidade óptica foi monitorada em 650 nm (Espectrofotômetro Agilent 8453). Foi

construída uma curva de calibração relacionando massa celular seca e densidade óptica a 650 nm, apresentada no Anexo I.

3.9.3 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS LIPASES PRODUZIDAS

As lipases produzidas (dos diferentes substratos) foram parcialmente caracterizadas em relação à especificidade aos substratos de esterificação, à estabilidade em temperaturas altas, baixas e ambiente e ao comportamento frente a diferentes memórias de pH e temperaturas.

3.9.3.1 Especificidade aos substratos de esterificação

A especificidade das lipases produzidas com os diferentes substratos: farelo de soja, bagaço de cana e farelo de arroz, em relação a diferentes substratos para a reação de esterificação foi avaliada. A atividade lipásica foi medida conforme descrito no item 3.9.2.2 utilizando-se como ácidos graxos os ácidos oléico, butírico e láurico, e como álcoois o metanol, etanol, propanol e butanol nas proporções molares de 1:2 (ácido graxo:álcool).

3.9.3.2 Estabilidade à temperaturas

Estabilidade em altas temperaturas

Para a determinação da estabilidade térmica das lipases produzidas em diferentes substratos, as amostras liofilizadas foram incubadas em diferentes temperaturas (35 °C, 45 °C e 60° C). A atividade de esterificação foi monitorada até a perda total de atividade em intervalos de 24 horas.

Estabilidade em baixas temperaturas e temperatura ambiente

Foram armazenadas amostras das enzimas produzidas utilizando diferentes substratos (FS, FA e BC) em geladeira (4 °C), refrigerador (-10 °C) e em temperatura ambiente. A atividade lipásica (esterificação) de cada uma das enzimas foi medida a cada 10 dias, a fim de monitorar a estabilidade das mesmas em diferentes temperaturas de armazenamento.

3.9.3.3 Efeito da temperatura e memória de pH na atividade lipásica

As enzimas produzidas foram pré-incubadas em diferentes tampões de pH (de 3,0 a 10,0) por 20 minutos a 4 °C e liofilizadas, de acordo com a metodologia descrita por Sun, Xu e Wang (2009). A atividade de esterificação das amostras foi medida em diferentes temperaturas (de 11,8 °C a 68,2 °C) seguindo a metodologia descrita no item 3.9.2.2.

Os efeitos do pH e temperatura nas lipases produzidas a partir dos diferentes substratos foram avaliados por meio de DCCR 2². A Tabela 3 apresenta os níveis de pH e temperatura nos quais o comportamento de cada uma das lipases foi avaliado.

Tabela 3. Níveis investigados na avaliação do efeito temperatura e da memória de pH na atividade de esterificação.

Variáveis/níveis	Temperatura (°C)	pH
-1,41	11,8	3
-1	20	4
0	40	6,5
1	60	9
1,41	68,2	10

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO

A Tabela 4 apresenta os resultados da caracterização dos farelos (soja e arroz) e do bagaço de cana utilizados neste trabalho.

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

Tabela 4. Caracterização química dos substratos.

Substrato	Umidade (%)	Cinzas (%)	Lipídios (%)	Nitrogênio (%)	Proteínas (%)	Minerais mg/100g					pH
						Fe	K	Mg	Ca	Al	
Bagaço de Cana	7,74 ± 0,06	1,92 ± 0,04	0,63 ± 0,03	0,38 ± 0,01	2,37 ± 0,04	18,55 ± 1,57	304,50 ± 3,89	64,78 ± 1,39	46,93 ± 2,32	11,15 ± 0,50	4,37 ± 0,06
Farelo de Arroz	11,80 ± 0,23	9,10 ± 0,02	16,43 ± 0,81	2,07 ± 0,03	12,96 ± 0,21	6,19 ± 0,19	2041,93 ± 2,82	1074,14 ± 3,95	56,99 ± 0,87	4,35 ± 0,43	6,94 ± 0,01
Farelo de Soja	13,62 ± 0,38	5,60 ± 0,05	8,5* ± -	6,8* ± -	42,5* ± -	66,35 ± 3,72	344,50 ± 3,46	951,00 ± 1,73	- ± -	23,70 ± 0,08	6,70 ± 0,01

*Vargas (2004)

De acordo com a Tabela 4 os substratos, apresentam diferenças consideráveis quanto aos teores de cinzas, umidade, proteína, nitrogênio, lipídios e minerais. O farelo de arroz apresentou maior concentração de lipídios e o farelo de soja maior concentração de nitrogênio e proteínas. Teores menores de cinzas foram obtidos para bagaço de cana que apresenta também uma tendência de menores concentrações de minerais.

Quanto ao pH observou-se que os do farelos de arroz e de soja apresentam-se próximos à neutralidade. O bagaço de cana, no entanto, apresenta pH mais ácido.

Os teores de umidade obtidos para cada substrato foram levados em consideração nos ajustes de umidade dos meios durante os experimentos realizados em FES.

Ao se comparar a composição dos farelos de soja e arroz e do bagaço de cana utilizados neste estudo com outros substratos provenientes da agroindústria observa-se que o teor de nitrogênio do farelo de soja e lipídios do farelo de arroz é superior aos teores de outras tortas como a de babaçu e mamona, caracterizados anteriormente por Silva (2010). O mesmo autor avaliou ainda o pH desses substratos que variaram entre 7-8 para mamona e 6,5-7,5 para babaçu. A produção de cepas de *Rhizopus* sp. é favorecida quando o substrato usado para a bioconversão é o bagaço de mandioca devido as seus baixos valores de minerais e cinzas (Pandey e Soccol, 2000). A presença de íons cálcio e sódio no meio favoreceram o aumento da atividade enzimática (Germano *et al.*, 1998; Germano *et al.*, 2003).

Devido à relevância da utilização das tortas e farelos, muitos estudos têm avaliado o uso dos mesmos em bioprocessos. A Aplicação biotecnológica utilizando resíduos de girassol, soja, coco, mostarda, palma, algodão, canola, oliva entre outros, resultam na obtenção de enzimas, antibióticos, biopesticidas, vitaminas, entre outros. Na produção de enzimas, as tortas e farelos são usados como substratos para FES ou como suplemento do meio de produção, em termos de fonte de carbono e nitrogênio (Ramachandran *et al.*, 2007).

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

A literatura relata que a suplementação do meio com lipídios em alguns casos não é eficiente. Ao adicionar outras fontes de carbono complementar, ocorre a redução da produção, o que é atribuído à repressão catabólica pela fonte de carbono disponível no meio de cultura (Kamini *et al.*, 1998).

Optou-se neste trabalho por se realizar um estudo sistemático dos diferentes resíduos agroindustriais, sem suplementação, a fim de investigar o potencial dos mesmos para produção de lipases com a nova cepa de *Sporobolomyces ruberrimus* como uma alternativa de baixo custo.

4.2 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE LIPASE

4.2.1 Cinética da produção de lipase

Previamente à otimização da produção de lipase, foi realizado um ensaio cinético empregando os substratos investigados. O micro-organismo foi inoculado inicialmente em farelo de soja, baseando-se nas condições estabelecidas por Vargas *et al.* (2008). A Figura 3 apresenta a cinética em termos de atividade de esterificação para a lipase microbiana produzida em bagaço de cana, farelo de arroz e farelo de soja ao longo de 120 horas de fermentação. É possível observar que as maiores atividades de esterificação por FES para a levedura *Sporobolomyces ruberrimus* foram de 116,35 (em 72 h); 128,88 (em 48 h) e 269,39 (em 48 h) U/g de substrato seco (gss) para bagaço de cana, farelo de arroz e farelo de soja, respectivamente.

Observou-se para o bagaço de cana a necessidade de um maior tempo de fermentação (72 h) para atingir a máxima atividade de esterificação, quando comparado aos outros dois substratos (48 h de fermentação). Isso pode estar relacionado com a composição dos mesmos, sendo que o BC é o mais pobre dos substratos investigados, como observado no item 4.1. Desse modo, esse tempo foi fixado para a realização dos planejamentos experimentais.

Como conclusão parcial pode-se considerar que a utilização de suplementações como fonte de nitrogênio e fonte de carbono, com o objetivo de aumentar o teor nutricional dos substratos (FS, FA e BC) se fez desnecessária nos planejamentos, sendo que bons resultados preliminares foram obtidos, comparados com os existentes na literatura, com e sem adição de suplementos, favorecendo a produção de uma enzima viável economicamente. Portanto, pode-se considerar que ambos os substratos apresentam suficientes fontes para produção da enzima, dispensando a suplementação com fontes externas.

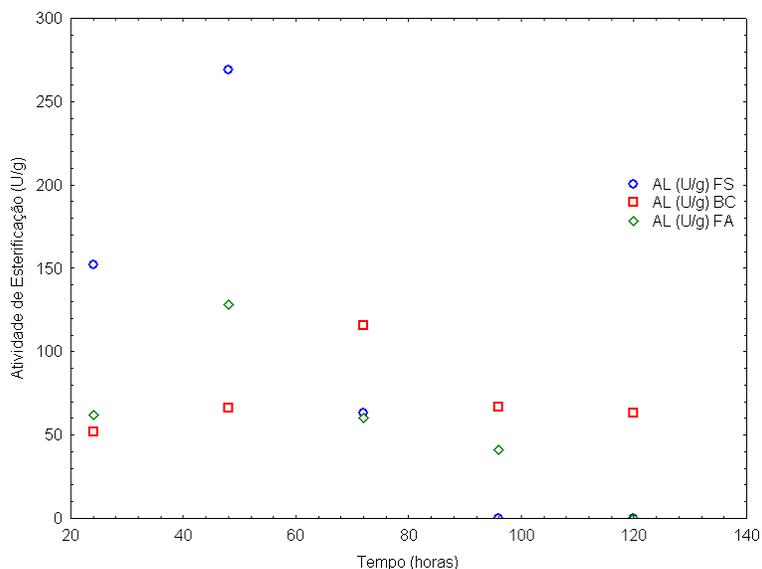


Figura 3. Cinética de produção de lipase microbiana com bagaço de cana, farelo de arroz e farelo de soja ao longo de 120 horas de fermentação a 27°C e umidade 55%.

4.2.2 Otimização da produção de lipase

De acordo com os resultados obtidos para o ensaio preliminar, a otimização da produção de lipase por *S. ruberrimus* foi realizada em 48 horas de fermentação para farelo de soja e farelo de arroz e em 72 horas de fermentação para bagaço de cana. A umidade e temperatura da fermentação em estado sólido foram as variáveis avaliadas e a atividade lipásica (AL) do extrato enzimático liofilizado, foi a resposta.

Para que as condições de produção de lipases pela levedura fossem otimizadas, foram realizados Delineamentos Completos Centrais Rotacionais 2² (DCCR) para cada um dos substratos investigados. As faixas de estudo foram ajustadas, em função dos resultados obtidos por Vargas *et al.* (2008) e dos testes preliminares realizados previamente.

A Tabela 5 apresenta os valores reais e codificados das variáveis independentes (umidade e temperatura) e as respostas em termos de atividade lipásica em 48 horas de fermentação para farelo de soja e farelo de arroz e 72 horas de fermentação para bagaço de cana.

É possível observar que a maior atividade lipásica para farelo de soja (143,48U/g) foi obtida no ensaio 7, seguida das atividades referentes aos pontos centrais (125,76, 130,13 e 134,5 U/g), obtidas nos ensaios 9, 10 e 11

respectivamente. O bagaço de cana apresentou os maiores valores de AL (163,77, 169,33 e 159,47 U/g, nos ensaios 9, 10 e 11 respectivamente) nos pontos centrais. A melhor resposta para a enzima produzida utilizando farelo de arroz como substrato foi obtida no primeiro ensaio (202,45 U/g). Contudo, a atividade lipásica obtida nessa condição experimental é bastante similar à atividade referente aos pontos centrais, sendo esta a segunda melhor resposta (189,54, 191,1 e 187,98 U/g, nos ensaios 9, 10 e 11, respectivamente).

Tabela 5. Matriz dos planejamentos experimentais realizados (valores codificados e reais com as respostas em termos de atividade lipásica) para avaliação dos diferentes substratos, após 48 horas de fermentação para FS e FA e 72 horas de fermentação para BC.

Ensaio	Umidade (%)	Temperatura (°C)	AL (U/g)		
			FS	BC	FA
1	-1 (50)	-1 (20)	97,17	150,53	202,45
2	+1 (70)	-1 (20)	98,7	119,13	109,09
3	-1 (50)	+1 (40)	19,29	43,68	111,93
4	+1 (70)	+1 (40)	33,3	43,26	110,25
5	-1,41(46)	0(30)	66,45	119,51	172,83
6	+1,41(74)	0(30)	127,27	56,41	91,86
7	0(60)	-1,41(16)	143,48	60,35	99,28
8	0(60)	+1,41(44)	0	13,14	21,69
9	0(60)	0(30)	125,76	163,77	189,54
10	0(60)	0(30)	130,13	169,33	191,1
11	0(60)	0(30)	134,5	159,47	187,98

As atividades lipásicas máximas se deram nas condições do ponto central ou seguidas dos mesmos, no entanto, as menores atividades foram obtidas nas condições experimentais referente ao ensaio 8 (T=44°C e U=60%) para FS, BC e FA, provavelmente devido à alta temperatura.

Nota-se que o micro-organismo tende a secretar maiores quantidades de enzima nos níveis intermediários de umidade e em temperaturas intermediárias,

seguidas das menores. 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).

Com a análise estatística dos planejamentos completos foi possível obter modelos empíricos para a atividade lipásica em função da temperatura e da umidade, para cada tempo de fermentação analisado. Os modelos codificados otimizados para 48 horas (FS e FA) e 72 horas (BC), respectivamente, podem ser visualizados nas Equações 7, 8 e 9 para a atividade lipásica e foram validados pelas análises de variância (ANOVA), apresentadas nas Tabelas 6 e 7 e 8, para FS, FA e BC, respectivamente.

$$AL48FS = 130,22 + 12,69 U (L) - 22,29 U^2 - 43,32 T (L) - 34,92 T^2 + 3,11 U (L) * T(L)$$

Equação 7

Onde:

AL= atividade lipásica em 48h de fermentação com farelo de soja (FS) ;

T= temperatura ;

U= umidade.

$$AL48FA = 189,39 - 26,22 U(L) - 19,24 U^2 - 24,91 T (L) - 55,38 T^2 + 22,91U (L) * T(L)$$

Equação 8

Onde:

AL= atividade lipásica em 48h de fermentação com farelo de arroz (FA);

T= temperatura ;

U= umidade.

$$AL72BC = 164,12 - 15,74 U (L) - 31,69 U^2 - 36,8 T (L) - 51,59 T^2 + 7,74U (L) * T(L)$$

Equação 9

Onde:

AL= atividade lipásica em 48h de fermentação com bagaço de cana (BC);

T= temperatura;

U= umidade.

Observa-se que os coeficientes de correlação obtidos (0,92, 0,91 e 0,94, respectivamente) e o valor de F calculado (2,2 vezes maior que o F tabelado para as atividades em 48h de fermentação utilizando FS, 2,0 vezes para 48h, utilizando

FA e 3,4 vezes para 72 h, utilizando BC) permitiram a validação dos modelos matemáticos com 95% de confiança. Com os modelos validados foi possível construir as superfícies de resposta que são apresentadas juntamente com as curvas de contorno na Figura 4, 5 e 6.

Tabela 6. Análise de variância para atividade lipásica no tempo de 48 h utilizando FS como substrato.

Fontes de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados Médio	F Calculado
Regressão	24030,78	5	4806,15	11,61
Resíduos	2068,43	5	413,68	
Total	26099,21	10		

Coeficiente de correlação: $R=0,92$

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

Tabela 7. Análise de variância para atividade lipásica no tempo de 48 h utilizando FA como substrato.

Fontes de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados Médio	F Calculado
Regressão	29786,12	5	5957,22	10,22
Resíduos	2913,25	5	582,65	

- Coeficiente de correlação: $R=0,91$
 - $F_{tab,95\%} = 5,05$

Tabela 8. Análise de variância para atividade lipásica no tempo de 72 h utilizando BC como substrato.

Fontes de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados Médio	F Calculado
Regressão	29637,49	5	5927,49	17,17
Resíduos	1725,12	5	345,02	
Total	31362,61	10		

Coeficiente de correlação: $R=0,94$

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

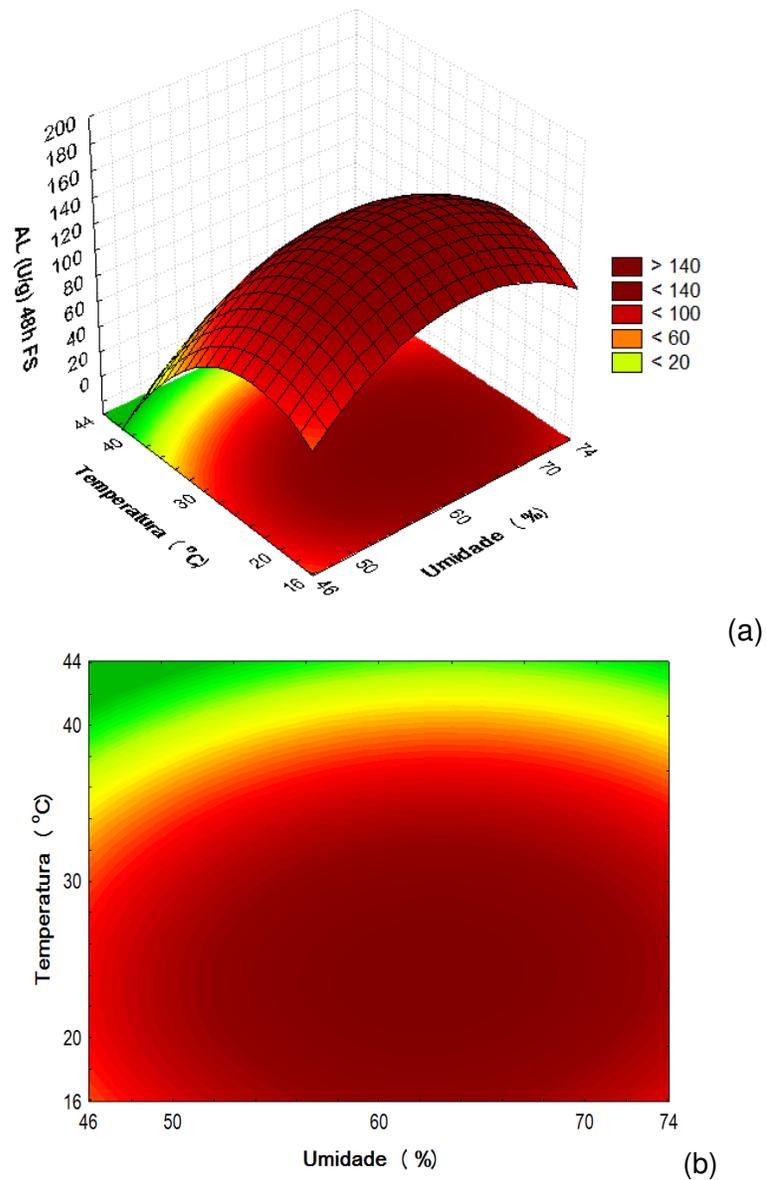


Figura 4. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de esterificação em 48 horas de fermentação e utilizando farelo de soja como substrato.

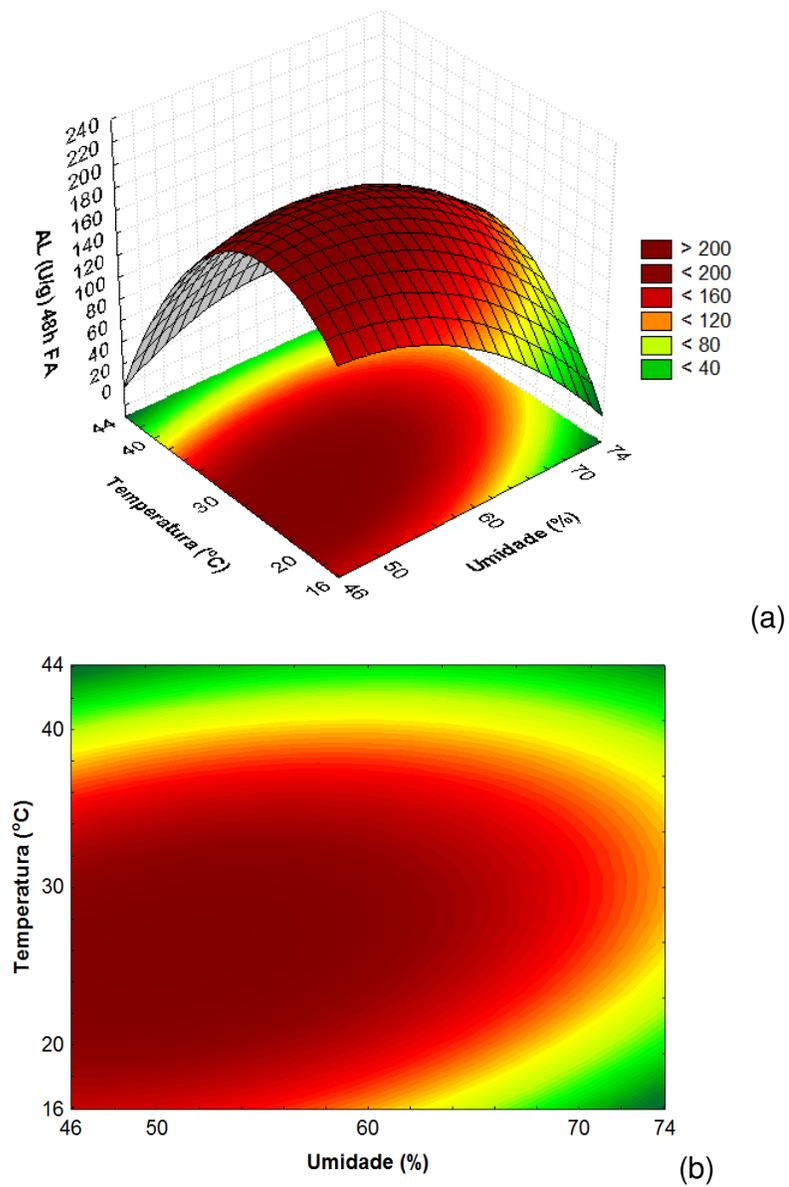
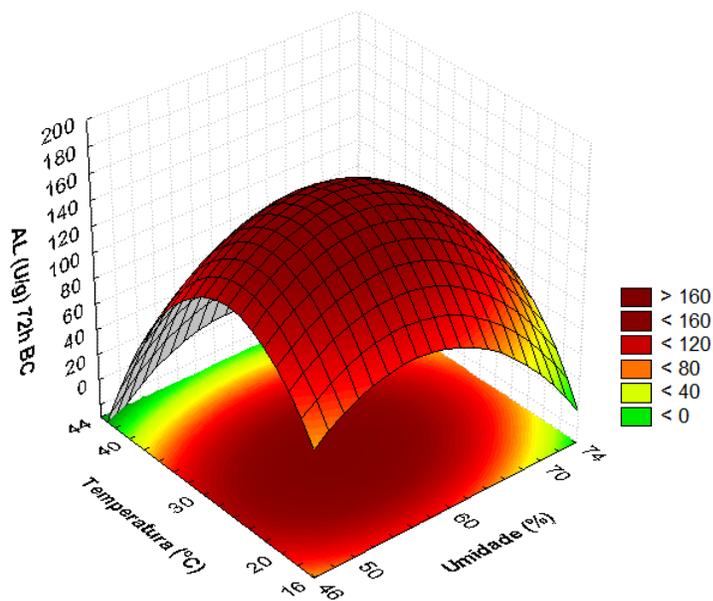
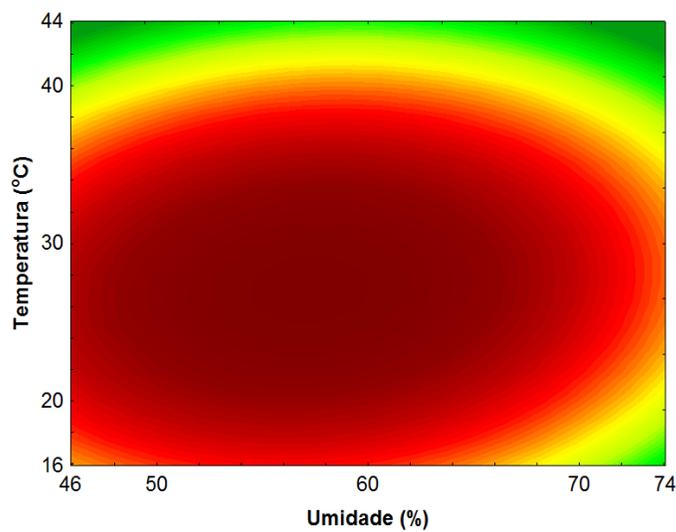


Figura 5. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de esterificação em 48 horas de fermentação e utilizando farelo de arroz como substrato.



(a)



(b)

Figura 6. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de esterificação em 72 horas de fermentação e utilizando bagaço de cana como substrato.

As superfícies de resposta mostram que em ambos os casos a maior (BC) ou a segunda maior atividade lipásica (FS e FA) se encontra em torno do ponto central o que determina a otimização da produção da enzima nas faixas estudadas ($T=30^{\circ}\text{C}$ e $U=60\%$), o que pode ser melhor observado nas curvas de contorno. Através desta

análise fica evidente que extremos de temperatura e umidade tendem a reduzir a produção de lipase, uma vez que baixas temperaturas reduzem a atividade metabólica e altas temperaturas podem levar à desativação enzimática. A umidade em níveis muito baixos prejudica o transporte de nutrientes e toxinas através da membrana e pode causar a perda das propriedades funcionais de enzimas da cadeia metabólica celular (Gervais e Molin, 2003).

O excesso de umidade reduz a porosidade do substrato prejudicando a transferência de calor e de oxigênio (Gutarra *et al.*, 2005; Pandey, 2003; Mitchell *et al.*, 2003; Mahadik *et al.*, 2002). Embora a presença da água seja uma necessidade para o micro-organismo em diversas funções, esta análise demonstra a importância de um controle nesse parâmetro.

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

No estudo realizado por Kempka *et al.* (2008) os autores encontraram condições de temperatura de 30°C e pH 7,0 como melhor condição para produção de lipases por *Penicillium verrucosum*.

A produção de lipase é influenciada pelo conteúdo de carbono no meio quando este é de origem lipídica (Mahadik *et al.*, 2002). Segundo alguns trabalhos publicados, este comportamento está diretamente relacionado ao mecanismo de regulação do micro-organismo em estudo. Assim, alguns casos relatam que a suplementação do meio com lipídios não é eficiente (Kamini *et al.*, 1998). Kiran *et al.* (2008) mostram que a suplementação de 1% de tributirina proporcionou a produção máxima da lipase alcalina de *Pseudomonas* sp. No entanto, ao adicionar outras fontes de carbono complementar, ocorria a redução da produção, o que foi atribuído à repressão catabólica pela fonte de carbono disponível no meio de cultura.

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

O impacto do conteúdo de umidade na matriz sólida é definido através das diferenças dos produtos formados na fermentação, pois este afeta a homogeneidade de crescimento da cultura (Chinn *et al.*, 2008). O alto conteúdo de umidade inicial na matriz sólida da fermentação mostra-se necessário, uma vez que desde o momento do inóculo até o final da fermentação, este diminuirá devido à evaporação acarretada pelo calor metabólico, ressaltando a necessidade de um balanceamento do conteúdo de água no substrato suporte da FES (Chinn *et al.*, 2008; Suryanarayan, 2003).

Alguns fatores devem ser ajustados para aumentar o desempenho da FES, de acordo com a especificidade do micro-organismo e do substrato utilizado, contribuindo para a secreção da enzima (Couto e Sanromán, 2006). Deve se considerar ainda que a porosidade do leito da fermentação em estado sólido e a área superficial estão diretamente relacionadas com a taxa de oxigênio distribuído e o espaço entre as partículas de substrato.

Estudos publicados referentes à produção de lipases em FES indicam a necessidade de 70% de umidade em suporte inerte (Avincel) (Chinn *et al.*, 2008) em torta de babaçu (Azeredo *et al.*, 2007; Gutarra *et al.*, 2005; Palma *et al.*, 2000) 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). Godoy *et al.* (2009) verificaram que a produtividade aumenta em elevadas a_w , sendo que após 48h de fermentação, o decréscimo da umidade e a_w foram observados e, em conseqüência, a atividade lipásica.

Condições ótimas para produção de lipases microbianas são de extrema importância sob a ótica industrial, pois permitem que a produção da enzima seja realizada em uma faixa de concentração dos componentes do meio, permitindo oscilações destas no processo, dentro da área estudada. Tais resultados são interessantes economicamente, também pelo fato de que concentrações intermediárias (ponto central) conduziram a elevadas atividades lipásicas.

4.3 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS LIPASES PRODUZIDAS

Após a otimização da produção da lipase em termos de atividade de esterificação, novas fermentações foram conduzidas, levando em consideração as condições ótimas de umidade (60%) e temperatura (30°C) para a produção dos

extratos enzimáticos a serem caracterizados parcialmente. A caracterização foi realizada nos extratos provenientes das enzimas produzidas por ambos os substratos (FS, FA e BC).

As enzimas produzidas foram caracterizadas parcialmente em relação à estabilidade em temperaturas altas e baixas, especificidade ao substrato de esterificação (diferentes ácidos graxos e álcoois) e faixas de temperatura de atuação e memória de pH.

4.3.1 Especificidade aos substratos de esterificação

Ésteres são importantes compostos orgânicos com um número crescente de aplicações comerciais. Estes compostos são amplamente utilizados para a preparação de compostos aromáticos (*flavors*), cosméticos, detergentes, sabores e produtos farmacêuticos. Muitos dos ésteres disponíveis são produzidos por sínteses químicas ou enzimáticas. A produção biotecnológica de ésteres utilizando lipases tem recebido grande atenção por causa das condições de reações brandas (temperatura, pH e pressão) envolvidas, o elevado grau de pureza alcançado, bem como a aceitação destes produtos na indústria de alimentos (Martínez-Ruiz *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2002).

Foram testados neste trabalho três ácidos graxos com cadeias carbônicas diferentes: ácido butírico e ácido láurico, com cadeia carbônica saturada (4 e 12 carbonos, respectivamente) e ácido oléico (18 carbonos e cadeia insaturada). As atividades lipásicas das enzimas empregando cada ácido graxo foram avaliadas utilizando quatro álcoois com diferentes números de carbono nas cadeias; metanol, etanol, 1-propanol e 1-butanol, que apresentam, respectivamente, 1, 2, 3 e 4 átomos de carbono na cadeia carbônica.

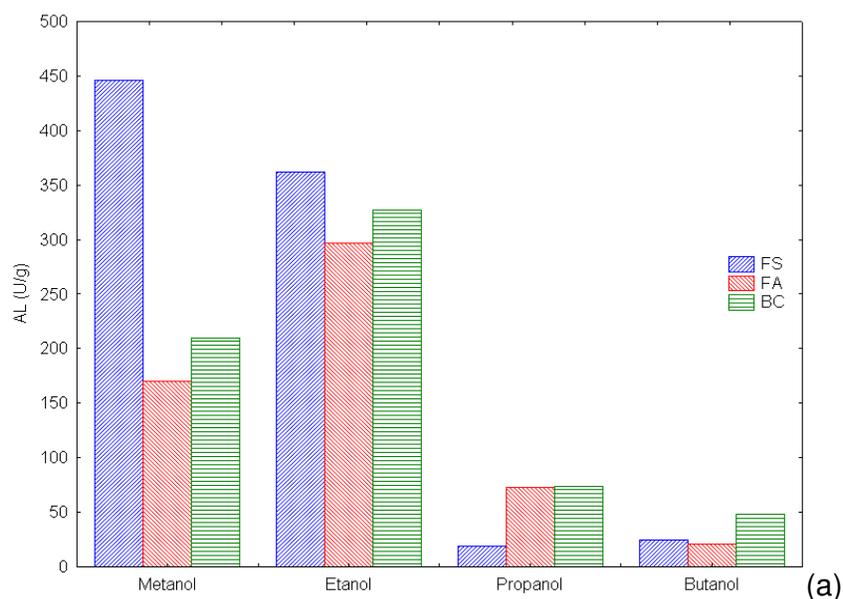
As atividades lipásicas dos extratos enzimáticos liofilizados referentes ao emprego dos ácidos butírico e oléico como substratos para as reações de esterificação utilizando diferentes álcoois estão apresentadas nas Figuras 7 (a) e (b), respectivamente. A avaliação das atividades foi realizada de acordo com as condições descritas no item 3.9.3.2.

De uma forma geral, o emprego do ácido butírico como doador acila resultou nas maiores atividades lipásicas, com um pico de atividade de 446,50 U/g para a enzima produzida utilizando farelo de soja (FS) 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, como mostra a Figura 7 (a).

Semelhante à enzima produzida com FS, também pode ser observada uma maior especificidade das enzimas obtidas por BC e FA, que apresentaram atividades 327,04 e 296,38 U/g, respectivamente quando do emprego de etanol como álcool na reação com ácido butírico como ácido graxo.

Uma tendência de maior especificidade, também pode ser observada para o álcool etanol quando do emprego de ácido oléico como substrato para a reação de esterificação. As melhores atividades foram obtidas quando do uso para FS e FA com etanol (130,84 e 126,47U/g, respectivamente). Os alcoóis metanol e propanol apresentaram atividades semelhantes quando reagiram com ácido oléico como pode ser observado na Figura 7 (b).



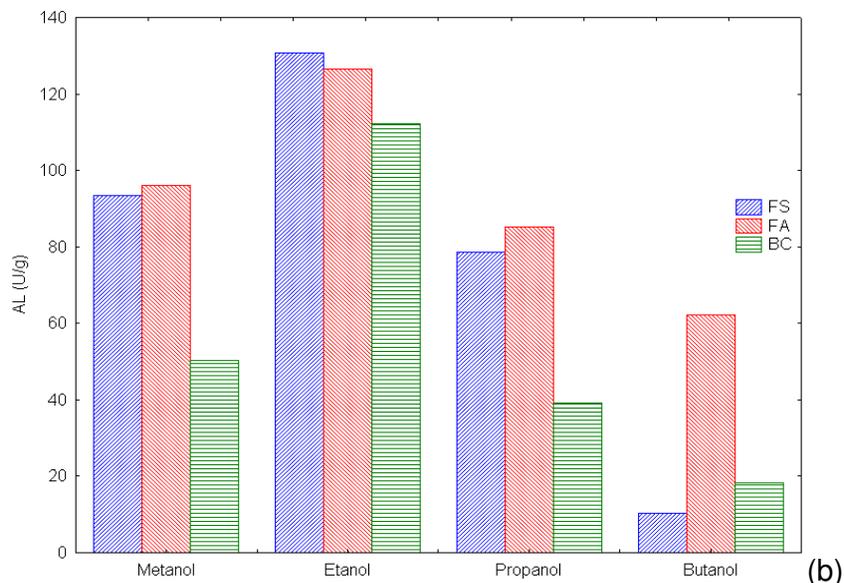


Figura 7. Atividades lipásicas das enzimas produzidas utilizando ácido butírico (a) e ácido oléico (b) como doadores acila.

O ácido láurico também foi testado como doador acila, nos diferentes alcoóis (metanol, etanol propanol e butanol). Para este ácido graxo, as enzimas produzidas, em geral, não apresentaram atividade significativa. Apenas a enzima produzida utilizando FS como substrato apresentou atividade de esterificação de 8,72 e 14,95U/g, quando empregado metanol e etanol, respectivamente. Não foram observadas atividades para as enzimas provenientes de FA e BC com nenhum dos álcoois empregados, etanol, propanol ou butanol. Esse fato pode ser devido à maior especificidade das enzimas avaliadas para ácidos graxos de cadeia longa insaturados, como o ácido oléico, e não saturados, como o ácido láurico.

Os dados apresentados mostram que, de uma forma geral, as enzimas apresentaram maior especificidade em relação ao ácido graxo de cadeia curta (ácido butírico) e aos álcoois de menor cadeia carbônica (metanol e etanol).

Comportamento semelhante foi observado por Smaniotto (2010), na produção de lipases sintéticas por fermentação submersa (FS), em meio industrial, utilizando a mesma cepa de *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 como doador acila resultou na maior atividade lipásica de 404,3U/g_{extrato liofilizado} para o extrato enzimático bruto com metanol.

A maior especificidade em relação ao ácido graxo de cadeia curta obtido neste trabalho concorda com os resultados apontados por Peter e Preda (2002), que avaliaram a especificidade de uma lipase de pâncreas de porco em relação a diversos ácidos graxos (de 3 a 18 carbonos). Segundo esses autores, a lipase avaliada apresentou uma elevada especificidade em relação aos ácidos valérico (C5) e butírico (C4), e uma atividade de esterificação significativamente menor para ácidos com números de carbono menores (propiónico) e maiores (C6-C16). A especificidade voltou a aumentar para ácidos de cadeia longa (C18), porém permaneceu significativamente mais baixa para os substratos anteriores.

A especificidade da lipase imobilizada de *Mucor* sp. em relação a ácidos graxos de cadeia curta (ácidos propiónico, butírico e capróico) foi avaliada por Abbas e Comeau (2003). Apesar de estes ácidos terem sido previamente relatados na literatura como possíveis inibidores das propriedades catalíticas das lipases, todos foram capazes de realizar a reação de esterificação empregando diversos álcoois. 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); Sun *et al.*, (2009); Gaur *et al.*, (2008) e Wang *et al.* (2009).

Em relação ao tamanho da cadeia carbônica dos álcoois, quanto à especificidade, a lipase estudada por Abbas e Comeau (2003) apresentou uma afinidade particular por álcoois de cadeia mais curta, como metanol, etanol, 2-propen-1-ol e butanol. Esse resultado discorda de outros apresentados na literatura, como Langrand *et al.* (1990) e Sun *et al.*, (2009), em que os rendimentos decresceram com o aumento do número de átomos de carbono presentes nos álcoois.

As variadas afinidades de uma lipase por diferentes álcoois podem ser entendidas em termos da energia de ligação que é liberada quando um substrato se liga ao sítio ativo. Substratos como o metanol e etanol, que são pequenos, não liberariam energia suficiente para uma alteração na conformação da lipase para a sua forma ativa.

Contudo, apesar de álcoois de cadeia maior ser capazes de liberar maiores energias de ligação, uma parte dessa energia é requerida para modificar a conformação do substrato para que este caiba no sítio ativo da enzima. Então, apenas uma pequena parte da energia liberada estaria disponível para a mudança na conformação da enzima (Ghandi *et al.*, 1995; Abbas e Comeau, 2003). Estas alterações na conformação das lipases para torná-las ativas dependem de ambos os substratos que estão sendo empregados na reação de esterificação (ácido graxo e álcool). Sendo a afinidade das enzimas pelos substratos interdependentes em relação à cadeia carbônica e à estrutura de ambos, a especificidade não pode ser avaliada separadamente.

Tendo em vista os resultados apresentados, os extratos enzimáticos obtidos apresentam potencial para catalisar reações de esterificação entre álcoois e ácidos graxos de cadeia curta, produzindo ésteres usualmente empregados na indústria como *flavors*. Estes ésteres, em geral, são obtidos por via química, porém o seu valor de mercado é muito inferior ao dos ésteres provenientes de fontes naturais. Esses compostos, por outro lado, podem ser considerados naturais se produzidos por síntese intermediada por lipases.

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; e Ozyilmaz e Gezer, 2009).

Considerando a produção de *flavors* intermediada pelas lipases produzidas nesta pesquisa, pode-se concluir que esta deve ser considerada promissora, sendo uma alternativa de aplicação viável comercialmente.

4.3.2 Estabilidade em diferentes temperaturas

O estudo da estabilidade é importante, pelo fato de permitir observar o comportamento da enzima e quanto de sua atividade inicial é preservada ao longo do armazenamento (Wolski *et al.*, 2009).

Uma das características requeridas de enzimas com potencial para aplicação industrial, como as lipases é a termoestabilidade uma vez que muitos processos utilizam temperaturas em torno de 50°C. Lipases microbianas têm sido estudadas com relação à termoestabilidade. Entretanto, não há padronização nas

metodologias, tornando difícil a comparação e o estabelecimento de regras gerais. O que se observa é que a estabilidade destas enzimas varia entre os gêneros, as espécies e até entre isoformas produzidas por uma mesma cepa. Há alguns exemplos de lipases estáveis em temperaturas acima de 70°C, como as lipases de *Bacillus circulans* (Kademi *et al.*, 2000) e *Pseudomonas cepacia* (Sugihara *et al.*, 1992).

Embora existam poucos relatos na literatura, outra característica muito importante a ser avaliada é a estabilidade da enzima quando armazenada em baixas temperaturas. Esta característica é importante para determinar o tempo em que a enzima poderá permanecer armazenada sem perder suas características iniciais em termos de atividade enzimática (Smaniotto, 2010).

4.3.2.1 Estabilidade em altas temperaturas

A estabilidade térmica dos extratos enzimáticos brutos liofilizados, produzidos pela levedura *Sporobolomyces ruberrimus* utilizando diferentes substratos (FS, FA e BC) nas temperaturas de 35 °C, 45 °C e 60 °C foi monitorada, quanto à atividade de esterificação, ao longo de 168 horas, em intervalos de tempos regulares a cada 24 horas.

A atividade lipásica (AL) relativa (%) foi associada à atividade inicial da enzima (tempo = 0 hora). As Figuras 8, 9 e 10 apresentam a atividade lipásica relativa (%) ao longo do tempo de incubação nas temperaturas de 35 °C, 45 °C e 60°C, respectivamente.

De acordo com os valores apresentados na Figura 8 é possível observar que dois dos extratos enzimáticos obtidos (utilizando FA e BC como substratos) sofrem uma pequena ativação quando incubadas a 35 °C. A enzima proveniente da fermentação utilizando como meio bagaço de cana apresentou um pico de atividade de esterificação após 48 horas de incubação e a enzima obtida com farelo de arroz, depois de sofrer desativação da atividade nas primeiras horas, apresentou leve ativação em 72 horas de incubação. Pode-se notar que a enzima proveniente da utilização de bagaço de cana como substrato apresentou maior pico de atividade e maior estabilidade, mantendo a atividade até 144 horas de incubação. As outras duas enzimas, por outro lado, quando submetidas a esta condição, sofrem desativação completa após 120 horas de incubação.

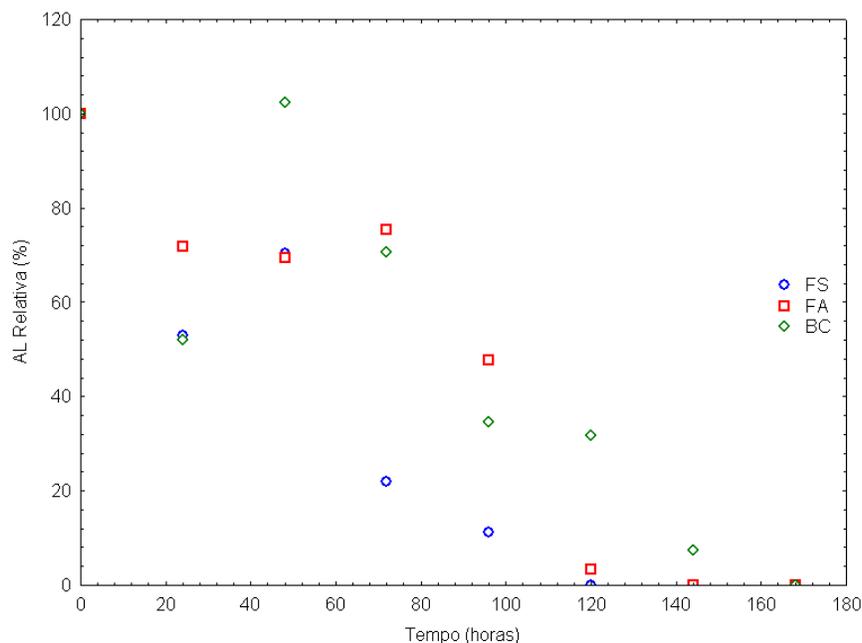


Figura 8. Estabilidade dos diferentes extratos enzimáticos em 35°C.

Cabe salientar, ainda, que a enzima obtida de farelo de arroz reteve 47,75% da sua atividade inicial após 96 horas de incubação a 35°C, mostrando-se mais estável até esse período quando comparada as outras (FS e BC) que apresentaram maior desativação nesse mesmo tempo.

Duas lipases purificadas foram avaliadas em termos de estabilidade por Sun *et al.* (2009), em relação à atividade hidrolítica, uma das lipases foi extremamente estável na faixa de temperatura de 30-50 °C por um período de incubação de 60 minutos.

Wolski (2008) avaliou a estabilidade térmica do extrato enzimático obtido utilizando *Penicillium* sp. livre e imobilizado em diferentes tempos (de 30 a 480 minutos) e temperaturas de 25 °C, 35 °C, 45 °C, 55 °C e 65 °C. Percebeu-se que os dois extratos apresentaram comportamento semelhante. Ambos apresentaram uma diminuição da atividade, no tempo zero de incubação e maior estabilidade em temperaturas de 25 °C e 35°C.

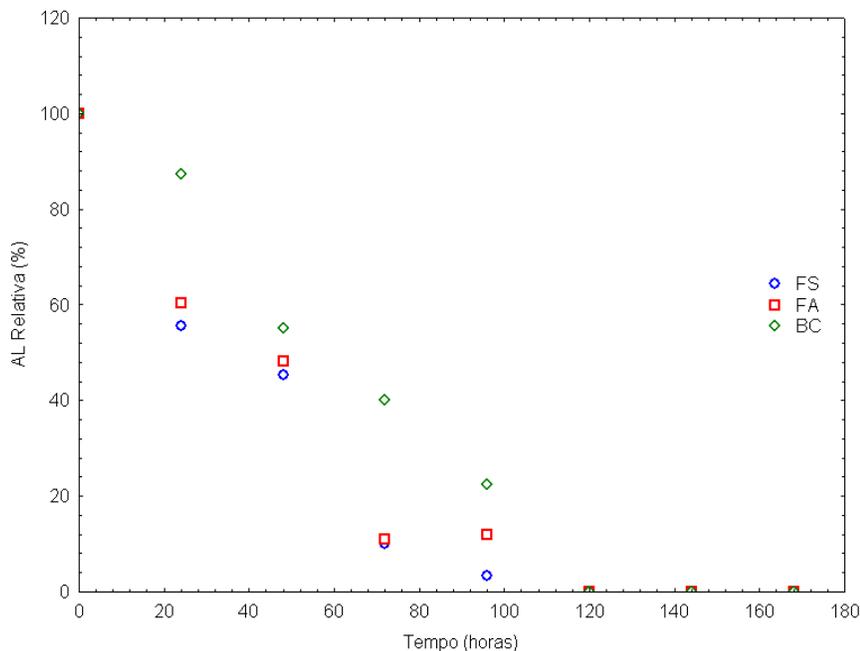


Figura 9. Estabilidade dos diferentes extratos enzimáticos em 45°C.

Quando incubadas em temperatura de 45 °C, de acordo com a Figura 9, as enzimas produzidas não sofreram ativação térmica nessa condição. Contudo, a enzima obtida com BC reteve 55 % da sua atividade inicial em 48 horas de incubação, seguidas das enzimas obtidas por farelo de arroz e farelo de soja que mantiveram 48,17 % e 45,45 % de suas atividades iniciais após esse mesmo período de tempo. Ambas as enzimas sofreram desativação completa após 96 horas de incubação, sendo que a enzima produzida utilizando bagaço de cana como substrato manteve maiores picos de atividade de esterificação em cada período de medida, quando comparada com as outras (FS e FA).

Smaniotto (2010) avaliou a estabilidade de lipases produzidas em diferentes meios (industrial e convencional), brutas e precipitadas incubadas em 45 °C. Lipases brutas, convencional e industrial, sofreram uma pequena ativação térmica após 20 horas de incubação (35 % e 10 % da atividade inicial, respectivamente). A enzima bruta produzida a partir de meio sintético sofreu desativação completa após 44 horas de incubação e a obtida em meio industrial, após 92 horas. A enzima precipitada convencional apresentou um pequeno aumento de atividade após 44 horas de incubação (10 %) e manteve a atividade até 92 horas, enquanto que a

enzima precipitada de meio industrial não apresentou ativação, no entanto manteve a atividade até 116 horas.

De acordo com a Figura 10 pode-se observar que a 60°C todos os extratos enzimáticos brutos apresentaram uma desativação térmica, sendo as enzimas oriundas de FA e BC as mais sensíveis a temperaturas elevadas, apresentando desativação total após 72 horas de incubação. O extrato obtido de FS manteve a atividade até 92 horas de incubação. É importante salientar que a última maior atividade medida foi no período de 72 horas pela enzima oriunda de BC.

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

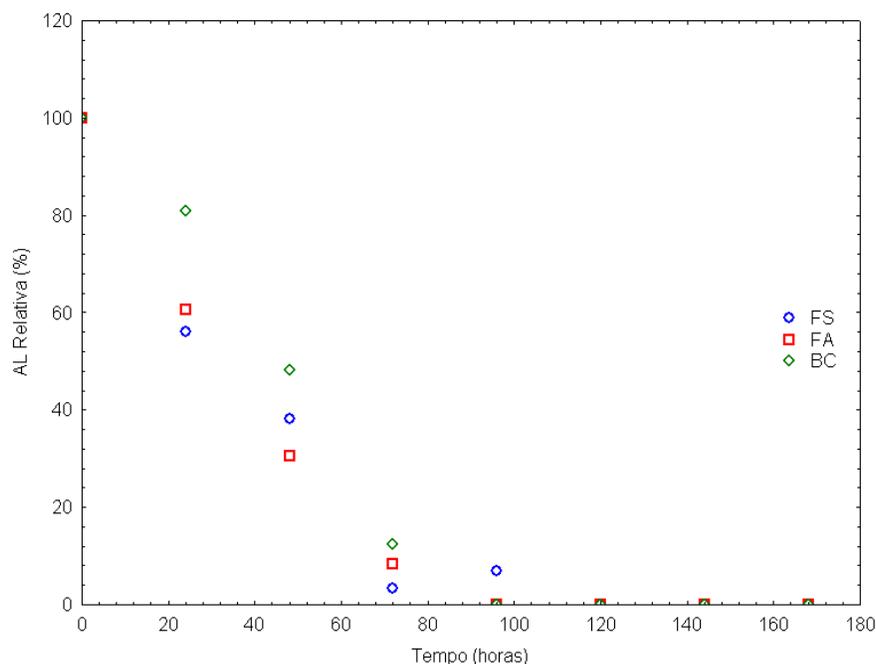


Figura 10. Estabilidade dos diferentes extratos enzimáticos em 60°C.

Cao *et al.* (2009) estudaram a estabilidade de uma lipase produzida por *Burkholderia cepacia* encapsulada em sílica a 60°C. Foi observado um aumento de

cerca de 40% na atividade após 1 hora de incubação, porém após 12 horas a atividade foi reduzida à cerca de 50 % do valor inicial. No trabalho realizado por Fernandes *et al.* (2004), em temperaturas mais elevadas (37 °C, 50 °C e 60 °C) a enzima perdeu a sua atividade rapidamente, mantendo menos de 40 % da atividade inicial após 30 minutos de incubação.

De acordo com Sharma *et al.* (2001), a estabilidade térmica de uma lipase está relacionada com a sua estrutura, sendo influenciada por diversos fatores ambientais. O fator mais importante é o meio em que a enzima se encontra, já que a presença de água diminui fortemente a termoestabilidade (Reetz, 2002).

4.3.2.2 Estabilidade em baixas temperaturas e temperatura ambiente.

As estabilidades dos extratos enzimáticos liofilizados das enzimas produzidas pela levedura *Sporobolomyces ruberrimus* utilizando diferentes substratos (FS, FA e BC) armazenados em refrigerador (4 °C), congelador (-10 °C) e temperatura ambiente foram monitoradas ao longo de cerca de 60 dias. Neste período foram determinadas as atividades de esterificação em intervalos de tempos regulares, a cada dez dias.

A atividade lipásica (AL) relativa (%) foi associada à atividade inicial da enzima (tempo = 0 hora). As Figuras 11, 12 e 13 apresentam os perfis de atividade lipásica relativa (%) ao longo do tempo de armazenamento em refrigerador (4°C), congelador (-10°C) e temperatura ambiente, respectivamente.

De acordo com os valores apresentados na Figura 11, pode-se verificar que as lipases produzidas com FS e FA, quando armazenadas em refrigerador (4 °C) diminuem suas atividades após 10 dias de armazenamento e sofrem uma espécie de ativação, apresentando picos de atividade após 20 dias (10,06 % e 9,22 % em relação às atividades iniciais, respectivamente).

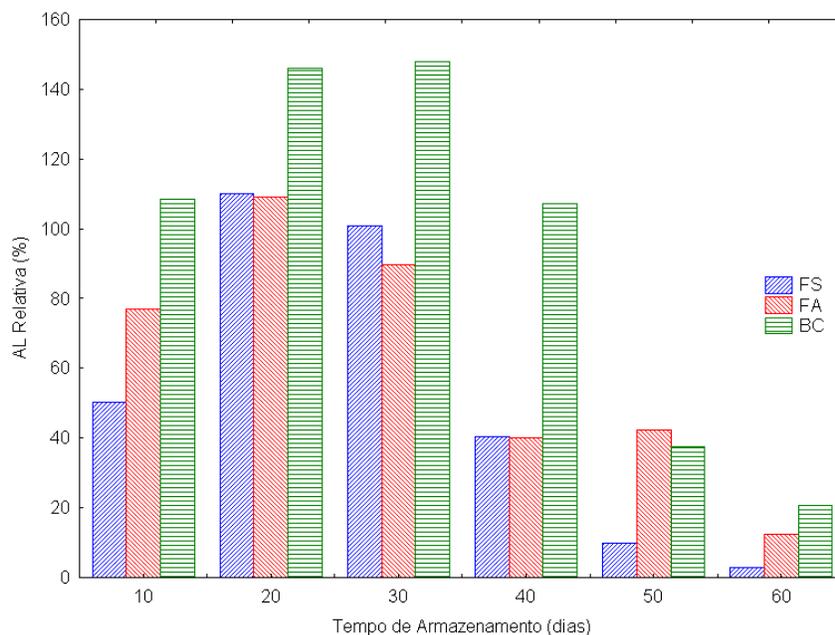


Figura 11. Atividades lipásicas relativas (%) das enzimas ao longo do período de armazenamento em refrigerador (4°C).

A enzima produzida utilizando BC como substrato apresenta uma ativação crescente da atividade, atingindo um pico após 30 dias de incubação (68,24% em relação à atividade inicial). Ainda é possível observar que a enzima obtida com BC apresentou atividade relativa superior a 100% em relação à inicial após 40 dias e as obtidas de FS e FA apresentaram atividades inferiores a 50% da atividade inicial após o mesmo período.

Resultado semelhante foi encontrado por Silva (2010), que estudou a estabilidade do extrato enzimático obtido a partir de *Penicillium brevicompactum* estocado durante 86 dias em refrigerador, na temperatura de 4 °C. Neste período foram determinadas as atividades de esterificação a cada dez dias, observando que do 10º ao 20º dia a atividade aumentou gradativamente até atingir seu pico no 30º dia, após este período apresentou decréscimo e manteve sua atividade do 40º até o 86º dia.

A partir da Figura 12 é possível observar que ocorre melhor manutenção das atividades enzimáticas no armazenamento das enzimas sob congelamento (-10 °C) quando comparada ao armazenamento em refrigerador (4 °C). As enzimas obtidas a partir de FS e BC apresentaram ativação das atividades relativas (%), quando

comparadas às suas atividades iniciais, apresentando picos após 10 e 20 dias, respectivamente.

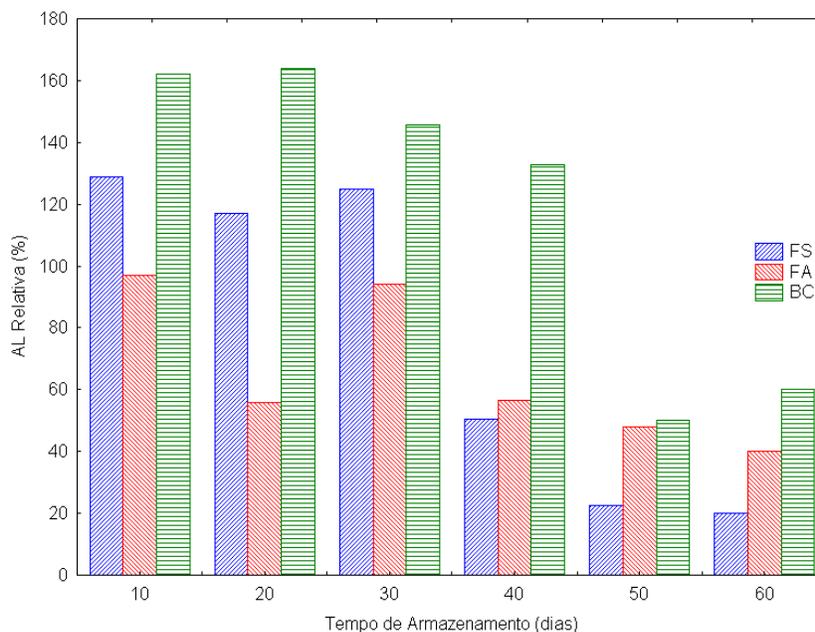


Figura 12. Atividades lipásicas relativas (%) das enzimas ao longo do período de armazenamento em congelador (-10°C).

Ainda é possível observar que durante todo o período de medida de atividade relativa (%) a lipase produzida com BC apresentou maior estabilidade, mantendo sua atividade superior a 50 % e apresentando uma pequena ativação após os 60 dias. De acordo com Menoncin (2007), esta ativação na atividade pode ser explicada pelo fato de que algumas enzimas possuem o potencial de se regenerar.

No trabalho realizado por Wolski *et al.* (2009), a estabilidade durante o armazenamento de extratos enzimáticos brutos provenientes de fermentação sólida e submersa de *Penicillium* sp. em baixas temperaturas foi avaliada em relação à atividade de hidrólise dos extratos. As atividades foram mantidas até cerca de 100 dias quando do armazenamento a 10 °C e cerca de 125 dias estocada à -10 °C. Tempos maiores de armazenamento conduziram a um decaimento gradual na atividade lipásica e os extratos foram parcialmente inativados.

Segundo Menoncin (2007), a atividade hidrolítica do extrato enzimático bruto obtido da FES de *P. verrucosum* e farelo de soja decresceu até o 98º dia de armazenamento. Após este período a atividade aumentou, sendo este aumento

mantido durante os demais dias de armazenamento, sendo que com 218 dias a enzima permanecia com 80% de sua atividade inicial.

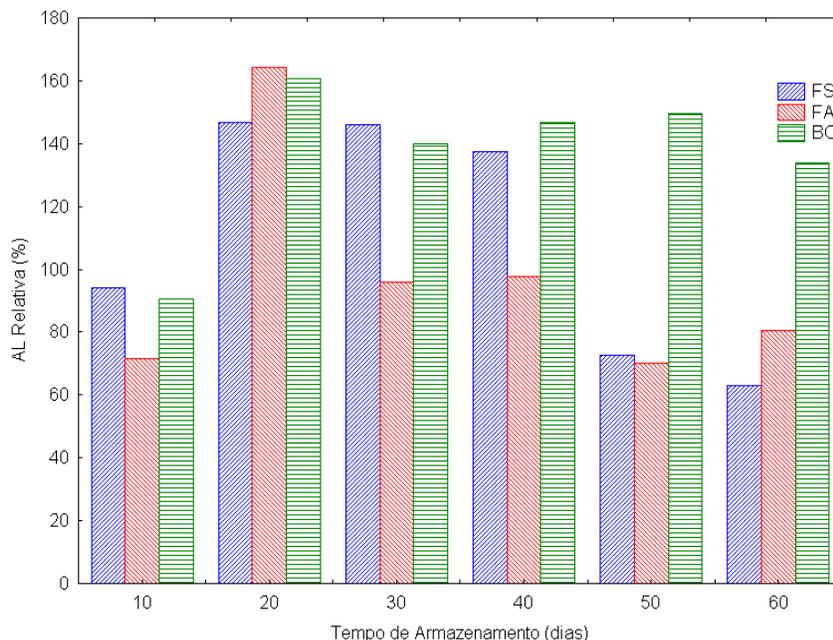


Figura 13. Atividades lipásicas relativas (%) das enzimas ao longo do período de armazenamento em temperatura ambiente.

O armazenamento em temperatura ambiente, observado na Figura 13, mostra que há uma tendência de melhor manutenção das atividades enzimáticas quando do armazenamento das enzimas em temperatura ambiente para as lipases produzidas pela nova cepa da levedura *Sporobolomyces ruberrimus*, por FES utilizando como substratos resíduos agroindustriais (FS, FA e BC).

As amostras de cada enzima foram armazenadas em temperatura ambiente no próprio laboratório sem intervenção de calor e umidade excessivos e as medidas de atividade de esterificação foram feitas em intervalos de tempos regulares a cada dez dias.

A Figura 13 também mostra que as enzimas apresentaram um pico de atividade com aumento de 46,86, 64,39 e 70,56% em relação à atividade inicial após 20 dias de incubação para as lipases obtidas de FS, FA e BC, respectivamente. É importante salientar que as enzimas produzidas com FS e FA

mantiveram atividade relativa acima de 50 % comparada à inicial, após os 60 dias de análise.

De um modo geral, a enzima obtida com BC apresentou maior estabilidade, mantendo atividade relativa (%) acima de 100 % da inicial quando conservada em temperatura ambiente e 50% em congelador (-10 °C), após os 60 dias.

Demir e Tükel (2009) avaliaram a estabilidade ao longo do armazenamento a temperatura ambiente e 5 °C de uma lipase de *Spirulina platensis* purificada, em relação à atividade de hidrólise. As estabilidades da lipase foram praticamente as mesmas em ambas as temperaturas após 5 dias de armazenamento. Contudo, a lipase reteve 51 % de sua atividade inicial após 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente e 38 % da sua atividade inicial após o mesmo período a 5 °C.

A termoestabilidade da lipase pode ser afetada por mudança de pH ou presença de íons metálicos. Em alguns casos sua desnaturação térmica ocorre quando o desdobramento dos polipeptídeos no sítio ativo fica em estado intermediário (Zhu *et al.*, 2001). A estabilidade de uma enzima pode ser aumentada se for empregada a técnica de imobilização (Hiol *et al.*, 2000).

De acordo com Sharma *et al.* (2001), a estabilidade térmica de uma lipase está relacionada com a sua estrutura, sendo influenciada por diversos fatores ambientais. O fator mais importante é o meio em que a enzima se encontra, já que a presença de água diminui fortemente a termoestabilidade (Reetz, 2002).

4.3.3 Efeito da temperatura e memória de pH na atividade lipásica

As enzimas liofilizadas exibem uma memória de pH, isto é, a atividade da enzima liofilizada em solventes orgânicos é criticamente dependente do pH da solução aquosa antes da liofilização. A memória de pH é atribuída a uma fixação das ionizações dos grupos protéicos catalíticos após a secagem do biocatalisador, sendo que os grupos funcionais ionizáveis aparentemente mantêm o seu estado de ionização em meios não-aquosos (Sun *et al.*, 2009; Sun e Xu, 2009).

A avaliação dos efeitos da temperatura e da memória de pH foi realizada para atividade lipásica dos diferentes extratos enzimáticos liofilizados obtidos com a levedura *Sporobolomyces ruberrimus* e utilizando resíduos agroindustriais (FS, FA e BC) como substrato.

Delimitamentos Completos Centrais Rotacionais 2^2 foram realizados para a determinação do comportamento das enzimas nessas condições, sendo a matriz dos planejamentos bem como os resultados obtidos em termos de atividade lipásica (AL, em U/g) apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Matriz dos planejamentos experimentais realizados (valores codificados e reais com as respostas em termos de atividade lipásica) para avaliação dos efeitos de temperatura e memória do pH.

Ensaio	pH	T (°C)	AL (U/g)		
			FS	FA	BC
1	-1 (4,0)	-1 (20)	101,25	102,22	124,44
2	+1 (9,0)	-1 (20)	21,4	89,74	123,86
3	-1 (4,0)	+1 (60)	13,59	0	0
4	+1 (9,0)	+1 (60)	0	41,17	0
5	0 (6,5)	-1,41(11,8)	0	33,62	0
6	0 (6,5)	1,41 (68,2)	0	0	9,33
7	-1,41(3,0)	0 (40)	0	33,96	56,53
8	1,41 (10,0)	0 (40)	43,23	56	74,66
9	0 (6,5)	0 (40)	132,67	107,33	166,02
10	0 (6,5)	0 (40)	143,23	106,27	139,56
11	0 (6,5)	0 (40)	128,44	128,44	133,2

Pode-se observar que os maiores valores de AL foram obtidos para a enzima produzida com BC na região do ponto central (média de 146,26 U/g), em um valor de memória de pH próximo à neutralidade (6,5) e temperatura de 40 °C. As melhores respostas para a enzima obtida de FS e FA também foram obtidas nos pontos centrais, apresentando médias de 134,78 e 114,01 U/g, o que mostra que as enzimas produzidas apresentam atividades maiores em condições mais amenas (pH neutro e temperatura mediana). Nos valores extremos de temperatura (11,8 °C e 68,2 °C, equivalentes aos ensaios 8 e 9), não foi observada atividade para a enzima obtida de FS e para as enzimas de FA e BC, baixas atividades foram obtidas. Em valores de pH alcalinos (9,0 e 10,0) e em valores mais baixos de pH (3,0 e 4,0), houve uma perda significativa da atividade enzimática em alguns casos e em outros não se observou atividade.

Semelhante a esses resultados nos trabalhos desenvolvidos por Sun *et al.* (2009) e Sun e Xu (2009), as enzimas estudadas exibiram máxima atividade em memórias de pH levemente ácidos e próximos à neutralidade (de 5,5 a 7,5). As memórias das enzimas em valores de pH alcalinos (acima de 8,0) e ácidos (abaixo de 6,0) resultaram em perda completa da atividade enzimática. Segundo esses autores, a perda na atividade pode ser devida a uma alteração significativa nos estados de ionização dos grupos amino nas proteínas liofilizadas.

O comportamento de lipases em memórias de pH 6,0, 6,5 e 7,0 e diferentes temperaturas, foi estudada pelos mesmos autores, sendo observadas as maiores atividades em valores medianos de temperatura (30-40 °C). As enzimas apresentaram atividade em temperaturas mais altas (50 °C e 60 °C). Contudo, em temperaturas menores (20 °C) a atividade foi baixa, provavelmente devido à reação se processar mais lentamente em tais condições.

Com a análise estatística do planejamento completo foi possível se obter um modelo empírico para a atividade lipásica para a avaliação dos comportamentos das enzimas frente a diferentes temperaturas e memórias de pH. Os modelos codificados otimizados para as enzimas de FS e FA, podem ser visualizados nas Equações 10 e 11, respectivamente.

$$AL = 134,68 - 4,07 \text{ pH (L)} - 50,83 \text{ pH}^2 - 13,67 \text{ T (L)} - 61,71 \text{ T}^2 + 16,56 \text{ pH (L)} * \text{ T (L)}$$

Equação 10

$$AL = 113,90 + 7,49 \text{ pH (L)} - 27,65 \text{ pH}^2 - 24,84 \text{ T (L)} - 41,82 \text{ T}^2 + 13,41 \text{ pH (L)} * \text{ T (L)}$$

Equação 11

Os modelos propostos foram validados por meio de análise de variância (ANOVA), em um nível de confiança de 95 % ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$), com coeficiente de correlação 0,84 para as duas enzimas otimizadas (FS e FA) e estão representadas na Tabela 13 (a) e (b), respectivamente.

Tabela 13 Análise de variância para a avaliação da significância estatística dos modelos propostos para a atividade lipásica (U/g) das enzimas.

Fontes de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado
Regressão	30663,30	5	6132,66	5,35
Resíduos	5727,82	5	1145,56	
Total	36391,12	10		

Coeficiente de correlação: $R=0,84$
 $F_{tab,95\%} = 5,05$

(a)

Fontes de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado
Regressão	17355,92	5	3471,18	5,45
Resíduos	3184,20	5	636,84	
Total	20540,12	10		

Coeficiente de correlação: $R=0,84$
 $F_{tab,95\%} = 5,05$

(b)

A validação dos modelos permitiu a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 14 (a) e (b), onde é possível observar que as enzimas provenientes da fermentação utilizando FS e BC como substratos apresentam as maiores atividades em temperatura mediana (cerca de 40 °C) e memórias de pH próximas à neutralidade (6,5). Através desta análise fica evidente que extremos de temperatura e memória pH tendem a reduzir a atividade ou desativar as enzimas produzidas nas condições descritas neste trabalho.

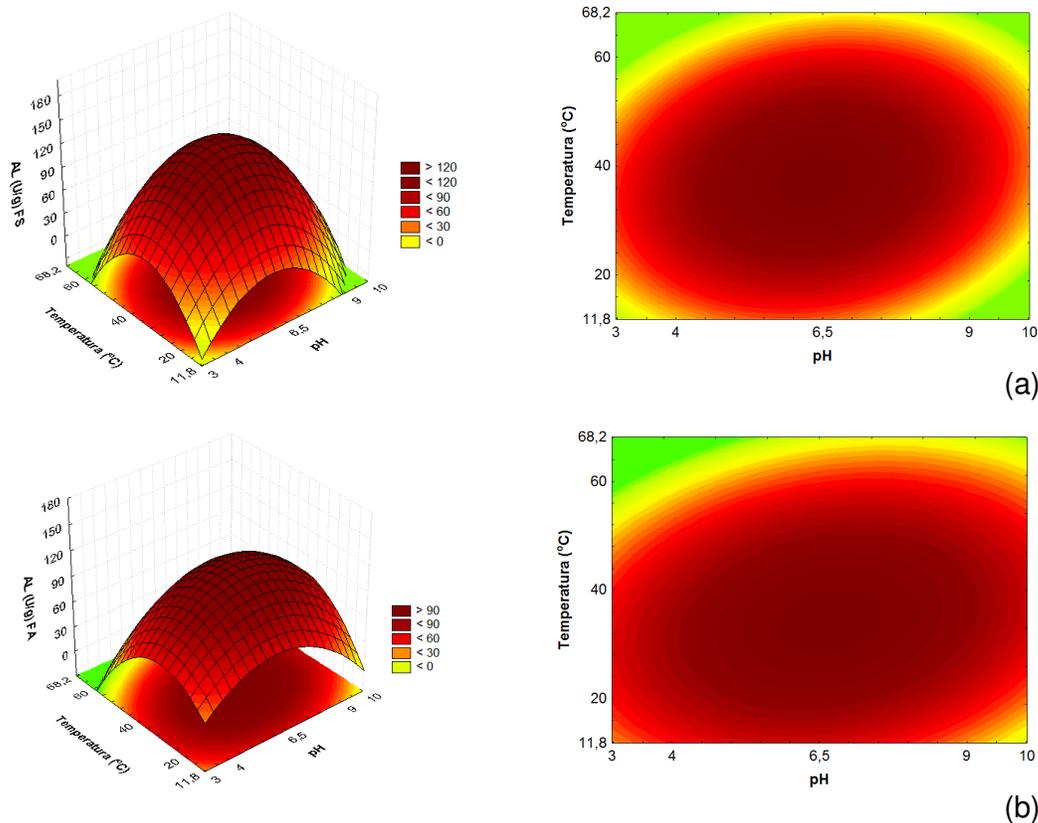


Figura 14. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a avaliação do comportamento da lipase produzida em diferentes temperaturas e memórias de pH, sendo (a) FS e (b) FA.

Estudando a caracterização de uma lipase bruta produzida por fermentação sólida de torta de babaçu utilizando *Penicillium simplissimum*, Gutarra *et al.* (2009) avaliaram os níveis ótimos de temperatura de e pH para a atividade lipásica hidrolítica por meio de um DCCR, variando a temperatura na faixa de 25 °C a 45 °C e o pH na faixa de 5,0 a 7,0. Um modelo de 2ª ordem foi validado por análise de variância, sendo que os valores máximos de atividade lipásica foram obtidos para temperaturas entre 37 °C e 45 °C e valores de pH entre 5,0 e 6,0. Com base nestes resultados, os autores realizaram novos experimentos para determinar a atividade lipásica em temperaturas entre 45 °C e 70 °C e pH 4,0-6,0, atingindo atividades máximas a 50 °C e pH entre 4,0 e 5,0.

Smaniotto (2010), estudando o efeito da temperatura e memórias de pH em diferentes lipases sintéticas, observou resultados semelhantes para enzimas brutas

obtidas de meio convencional que apresentaram os maiores valores de atividade lipásica sintética na região do ponto central (média de 145,07 U/ g_{extrato liofilizado}), em um valor de memória de pH próximo à neutralidade (6,5) e temperatura de 40 °C, confirmando a preferência dessas enzimas por pH neutro e temperatura mediana.

O mesmo autor observou ainda, que para as enzimas provenientes da fermentação do meio industrial, os maiores valores de atividades foram obtidos em uma ampla faixa de pH (de 4,0 a 9,0) e em temperaturas mais altas (de 40 °C a 68,2 °C). Nas condições de temperatura mais baixas e nos extremos de pH não foi observada atividade enzimática para nenhuma das enzimas provenientes da fermentação do meio industrial.

Ainda, conforme caracterização bioquímica de Hiol *et al.* (2000), a lipase produzida por *S. aurelis* NCTC 8530 teve sua atividade estabilizada em pH ótimo em torno de 6,0.

Os efeitos referentes à temperaturas e memórias de pH para a lipase produzida utilizando como meio BC estão expressos na forma de Gráfico de Pareto apresentado na Figura 15.

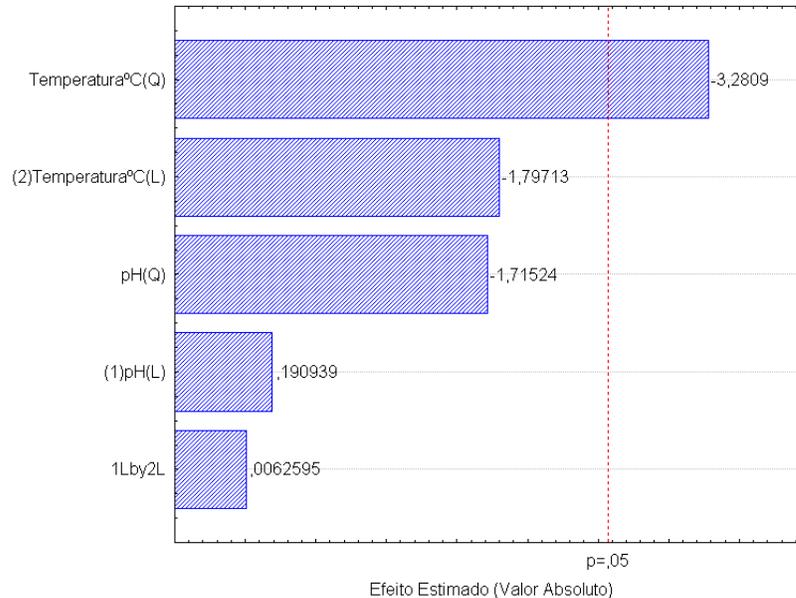


Figura 15. Diagrama de Pareto para determinação dos efeitos referentes à temperatura e memória de pH para a lipase produzida utilizando BC como substrato.

O diagrama de Pareto, construído com o objetivo de verificar o efeito de cada variável independente estudada na resposta, mostra que, em um nível de confiança

de 95%, somente a temperatura quadrática apresenta efeito significativo negativo. A análise do gráfico demonstra que não houve efeito significativo ($p < 0,05$) das variáveis independentes avaliadas na atividade enzimática.

Ozyilmaz (2009) avaliou o efeito da temperatura nas atividades de esterificação e de hidrólise de uma lipase comercial de *Candida rugosa* livre e imobilizada em sílica gel. As máximas atividades lipásicas para as enzimas livres foram observadas na faixa de 30-35°C. As enzimas imobilizadas exibiram valores máximos de atividade na faixa de 35-40°C.

Estudando uma lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y552, Burkert (2002) mostrou que esta enzima diminui sua estabilidade à medida que se aumenta a temperatura, concluindo que a enzima é mais estável à baixas temperaturas, como a de 30°C. Shu *et al.* (2006) estabeleceram que a enzima de *Antrodia cinamomea* foi alcalina tolerante, na faixa de pH de 7-10, com ótima atividade em pH 8,0 e atividade e estabilidade diminuídas significativamente em valor de pH maior que 10,0. Ainda, esta enzima mostrou ser estável em uma faixa de temperatura entre 25-60°C, com máxima atividade a 45°C.

O estudo da estabilidade das enzimas é um dos fatores de grande importância para a indústria, devido ao fato de algumas serem instáveis em determinadas condições de processamento, tornando-as rapidamente inativas. Muitas lipases têm sido caracterizadas em termos de suas atividades e estabilidades relativas ao pH e temperatura. É importante conhecer sua estabilidade para poder aplicar em condições ideais dos processos de interesse de uso da enzima.

A avaliação do efeito da temperatura e memória de pH foi de grande valia, levando em conta que poucos trabalhos existem atualmente publicados sobre o assunto. O planejamento de experimentos mostrou-se uma ferramenta valiosa, já que existem interações importantes entre os fatores que não são consideradas quando da análise dos efeitos da temperatura e memória de pH individualmente.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, a estratégia de fermentação em estado sólido empregada foi eficiente para a produção de lipase pela nova cepa de *Sporobolomyces ruberrimus* isolada, obtendo-se boas atividades lipásicas para diferentes resíduos agroindustriais utilizados como substrato.

Os substratos investigados, farelo de soja, farelo de arroz e bagaço de cana, conduziram a promissores resultados em termos de atividade de esterificação para as lipases produzidas. A condição otimizada, de acordo com as variáveis avaliadas foi 60% de umidade e temperatura 30°C.

As atividades lipásicas referentes aos pontos centrais, para as enzimas produzidas com farelo de soja foram 125,76, 130,13 e 134,5U/g. O bagaço de cana como substrato conduziu aos maiores valores para as atividades lipásicas de 163,77, 169,33 e 159,47U/g, nos ensaios referentes a região do ponto central . A melhor resposta para a enzima produzida utilizando farelo de arroz como substrato foi de 202,45U/g obtida no primeiro ensaio (T=20% e U=50%). Contudo, a atividade lipásica obtida nesta condição experimental é bastante similar às atividades referentes aos pontos centrais, sendo estas a segunda melhor resposta (189,54, 191,1 e 187,98U/g), demonstrando a preferência dessas enzimas por faixas intermediárias de umidade e temperatura.

A utilização dos resíduos agroindustriais como fontes alternativas de substratos para produção de enzimas podem auxiliar na redução da poluição ambiental, além de reduzir o custo global de produção de enzimas microbianas, levando em conta que o Brasil é um país rico, em se tratando destes resíduos, o que justifica a investigação dos mesmos na obtenção de produtos de alto valor agregado.

Os extratos enzimáticos liofilizados produzidos (em farelo de soja, farelo de arroz e bagaço de cana) foram parcialmente caracterizados em termos de especificidade ao substrato de esterificação, estabilidade em temperaturas altas e baixas e comportamento frente a diferentes temperaturas e memórias de pH.

Na avaliação da especificidade dos extratos enzimáticos frente a diferentes substratos de esterificação, as enzimas apresentaram, de uma forma geral, maior especificidade pelo ácido graxo de cadeia curta (ácido butírico) e por álcoois de menores cadeias carbônicas (metanol e etanol). Esse foi um resultado interessante já que existem poucas referências na literatura em relação à afinidade de lipases microbianas não-comerciais por substratos de cadeia curta.

Os substratos de cadeia curta, pelo qual as lipases produzidas neste trabalho apresentaram afinidade, produzem ésteres empregados na indústria como *flavors*, geralmente obtidos por via química (com valor de mercado muito inferior ao dos provenientes de fontes naturais); porém considerados naturais se produzidos por síntese intermediada por lipases. Desse modo, a produção de ésteres aromáticos intermediada pelas lipases produzidas nesse trabalho é uma alternativa de aplicação que pode ser levada em consideração.

As enzimas produzidas foram também avaliadas quanto à estabilidade quando submetidas a diferentes temperaturas, onde se pôde observar uma pequena ativação das mesmas quando incubadas a 35°C, sendo que a enzima proveniente da utilização de bagaço de cana como substrato apresentou maior pico de atividade e maior estabilidade, mantendo a atividade até 144 horas de incubação. As outras duas enzimas, por outro lado, quando submetidas a essa condição, sofrem desativação completa após 120 horas de incubação. Na temperatura de 45°C, as enzimas não sofreram ativação térmica, ambas as enzimas sofreram desativação completa após 96 horas de incubação, sendo que a enzima produzida utilizando bagaço de cana como substrato manteve as mais altas atividades relativas após cada medida. A 60°C, todas as enzimas apresentaram desativação térmica, apresentando desativação total após 72 horas de incubação.

A avaliação das enzimas quanto à estabilidade em baixas temperaturas e em temperatura ambiente, mostrou uma melhor manutenção das atividades enzimáticas em temperatura ambiente, seguida da estabilidade dessas enzimas em congelador (-10°C). Estes extratos enzimáticos demonstraram capacidade de se regenerar, quando sofreram desativação da atividade relativa e tornaram a ativar.

O comportamento das enzimas frente a diferentes temperaturas e memórias de pH foi avaliado através de Delineamentos Completos Centrais Rotacionais 2². As enzimas provenientes dos diferentes substratos (FS, FA e BC) apresentam as

maiores atividades em temperatura mediana (cerca de 40°C) e memórias de pH próximas à neutralidade (6,5).

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Tendo em vista os resultados apresentados neste trabalho, sugestões de trabalhos futuros são apresentadas a seguir:

- a) Avaliar o estudo de concentração do extrato enzimático obtido da FES em farelo de soja, farelo de arroz e bagaço de cana com a levedura *Sporobolomyces ruberrimus* a fim de se obter condições de maximização nas atividades de esterificação;
- b) Avaliar a estabilidade dos extratos enzimáticos em diferentes memórias de pH;
- c) Estudar o aumento de escala na FES com as condições maximizadas neste trabalho incluindo a otimização de variáveis ambientais de fermentação como, pH, agitação e aeração;
- d) Estudo de otimização da produção de lipase, incluindo a avaliação de outros resíduos agroindustriais, por meio da técnica de planejamento de experimentos;
- e) Aprimoramento da metodologia empregada para a determinação da atividade lipásica;
- f) Estudo da purificação e imobilização dos extratos enzimáticos concentrados;
- g) Estudo de aplicação das enzimas obtidas em reações de esterificação visando à produção de aromas (ésteres de cadeia curta).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, H. E COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003; 32:589-595.
- ALVAREZ-MACARIE, E.; BARATTI, J. Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2000; 10:377-383.
- 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*. 2005; 99:87-94.
- ALONSO, F.O.M. Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682). Rio de Janeiro: 2001. Dissertação de mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- ALKAN, H., BAYSAL, Z., UYAR, F., DOGRU, M. Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2006; 136:183-192.
- AL-ZUHAIR, S., DOWAIDAR, A., KAMAL, H. Dynamic modeling of biodiesel production from simulated waste cooking oil using immobilized lipase. *Biochemical Engineering Journal*. 2009; 44:256–262.
- AZEREDO, L. A. I., GOMES, P. M., SANT'ANNA JR, G., CASTILHO, L. R., FREIRE, D. M. G.,. Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. *Current Microbiology*. 2007; 54:361-365.

- BENJAMIN S., PANDEY A., Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Biology and Technology*, 2000; 43:453-460.
- BIANCHI, V. L. D., MORAES, I. O., CAPALBO, D.M.F. Fermentação em estado sólido, *Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica, 1ª edição, Ed. Edgard Blücher Ltda.* 2001; 2:247-276.
- BROZZOLI, V., CROGNALE, S., SAMPEDRO, I., FEDERICI, F., D'ANNIBALE, A., PETRUCCIOLI, M. Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. *Bioresource Technology*. 2009; 100:3395–3402.
- BURKERT, J.F. de M. Otimização das Condições de Produção da Lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552. Campinas: 2002. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- BUCALÁ, V.; FORESTI, M.L.; TRUBIANO, G.; FERREIRA, M.L.; BRIOZZO, M.; BOTTINI, S. Analysis of solvent-free ethyl oleate enzymatic synthesis at equilibrium conditions. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006; 38:914-920.
- CASA, R. M., SINISTERRA, J. V. E SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. Characterization and catalytic properties of a new crude lipase from *C. rugosa*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006; 38:599-609.
- CAO, X., YANG, J., SHU, L., YU, B. E YAN, Y. Improving esterification activity of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in sílica by bioimprinting with substrate analogues. *Process Biochemistry*. 2009; 44:177-182.
- CARVALHO, P. O., CAMPOS, P. R. B., NOFFS, M. A., OLIVEIRA, J. G., SHIMUZU, M. T., SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção

de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*. 2003; 26:75-80.

- CASTRO, H. F. E ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformations using lipases. *Química Nova*. 1995; 6:6-15.
- CHEIRSILP, B., JEAMJOUNKHAW, P., H-KITTIKUN, A. Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009; 59:206–211.
- CHINN, M.S., NOKES, S.E., STROBEL, H.J. Influence of process conditions on end product formation from *Clostridium thermocellum* 27405 in solid substrate cultivation on paper pulp sludge. *Bioresource Technology*. 2007; 98:2184–2193.
- CHINN M.S., NOKES S.E., STROBEL H.J.; Influence of moisture content and cultivation duration on *Clostridium thermocellum* 27405 end- product formation in solid substrate cultivation on Avicel. *Bioresource Technology*. 2008; 99:2664-2671.
- CHRISTEN, P, ANGELES, N. FARRES, A. E REVAH, S. *Lipase production by Rhizopus delemar grown on a synthetic support in solid state fermentation*. in: Roussos, E.S., Lonsane, B.K., Raimbault, M., Viniegra-Gonzalez, G. (eds.) Proceedings of the 2nd International Symposium on Solid State Fermentation (FMS95 Montpellier, França), *Kluwer Academic Publishers*, 1997, Londres.
- CHOWDARY, G.V.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Enzymatic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: a multivariate analysis. *Process Biochemistry*. 2001; 36:331-339.

- CORDOVA J., NEMMAOUI M., ISMAÏLI-ALAOUI M., MORIN A., ROUSSOS S., RAIMBAULT M., BENJILALI B.; Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1998; 5:75-78.
- COUTO, S. R., SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. *Journal of Food Engineering*. 2006; 76:291–302.
- DEMIR, B. S. E TÜKEL, S. S. Purification and characterization of lipase from *Spirulina platensis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009, in press DOI:10.1016/j.molcatb.2009.09.011.
- DAMASO, M. C. T.,¹; PASSIANOTO, M. A., FREITAS, S. C., FREIRE, D. M. G., LAGO, R. C. A. L., COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2008; 39:676-681.
- D'ANNIBALE, A., SERMANNI, G. G., FEDERICI, F., PETRUCCIOLI, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresource Technology*. 2006; 97:1828–1833.
- DI LUCCIO M., CAPRA F., RIBEIRO N.P., VARGAS G.D.L.P., FREIRE D.M.G., OLIVEIRA D.; Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2004:113-116, 173-180.
- DEVI, P.S.V., RAVINDER, T., JAIDEV, C. Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* by solid-state fermentation, *Journal of Invertebrate Pathology*. 2005; 88:163–168.
- DIZGEA, N., KESKINLERA, B., TANRISEVENB, A. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene–

divinylbenzene copolymer. *Biochemical Engineering Journal*. 2009; 44:220–225.

- DOMÍNGUEZ, A., COSTAS, M., LONGO, M.A., SANROMÁN, A. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*. 2003; 25:1225-1229.
- 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*. 2008; 147:63–75.
- ELLAIAH P., PRABHAKAR TT. , RAMAKRISHNA B., THAER TALEB A., ADINARAYANA K.; Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, 2004; 39: 525-528.
- ERTUGRUL, S., DÖNMEZ, G., TAKAC, S. Isolation of lipase producing *Bacillus sp.* from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*. 2007; 149:720–724.
- FERNANDES, M. L. M., KRIEGER, N., BARON, A. M., ZAMORA, P. P., RAMOS, L. P. E MITCHELL, D. A. Hydrolysis and synthesis reactions catalyzed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2004; 30:43-49.
- FICKERS, P., DESTAIN, J., THONART, P. Improvement of *Yarrowia lipolytica* lipase production by fed-batch fermentation. *Journal of Basic Microbiology*. 2009; 49:212 – 215.
- FREIRE, M. G. D.; CASTILHO, R. L. Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido. *Rev. Bras. Farm.*, Rio de Janeiro.1999; 81:48-56.

- FOJAN, P., JONSON, P.H., PETERSEN, M.T.N., PETERSEN, S.B.; What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie*. 2000; 82:1033-1041.
- FORESTI, M.L.; FERREIRA, M.L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida Antarctica B* adsorbed on polypropylene powder. *Catalysis Today*. 2005; 107-108:23-30.
- FORESTI, M.L.; ERRAZU, A.; FERREIRA, M.L. Effect of several reaction parameters in the solvent free ethyl oleate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilized on polypropylene powder. *Biochemical Engineering Journal*. 2005; 25 (1):69-77.
- GHANDI, N., SAWANT, S. B., JOSHI, J. B. Specificity of a lipase in ester synthesis: effect of alcohol. *Biotechnology Progress*. 1995; 11:282-287.
- GERMANO, S. *Desenvolvimento de bioprocessos para a produção, caracterização e purificação de proteases de Penicillium sp, por fermentação no estado sólido*. Curitiba: 2000. Tese de Doutorado. Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, UFPR.
- GERVAIS, P., MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 2003; 13:85-101.
- GODOY, M.G., GUTARRA M.L.E., MACIEL, F.M., FELIX, S.P., BEVILAQUA, J.B., MACHADO, O.L.T., FREIRE, D.M.G.; Use of a low-cost methodology for biodetoxification of castor bean waste and lipase production, *Enzyme and Microbial Technology*. 2009; 44:317-322.
- GUPTA, S., KAPOOR, M., SHARMA, K.K., NAIR, L.M., KUHAD R.C. Production and recovery of an alkaline exo-polygalacturonase from *Bacillus*

subtilis RCKunder solid-state fermentation using statistical approach, *Bioresource Technology*. 2008; 99:937–945.

- GUPTA, M. N. Enzyme function in organic solvents. *European Journal of Biochemistry*. 1992; 203:25-32.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004; 64:763-781.
- GUTARRA, M. L. E., GODOY, M. G., MAUGERI, F., RODRIGUES, M. I., FREIRE, D. M. G., CASTILHO, L. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplissimum* by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*. 2009; 100:5249-5254.
- GUTARRA, M.L.E., CAVALCANTI, E.D.C., CASTILHO, L.R., FREIRE, D.M.G.; Lipase Production by solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2005; 121-124:105-116.
- GÜVENÇA, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOGLU, U. The production of isoamyl Acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. *Process Biochemistry*. 2002; 38:379-386.
- HADEBALL, W. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. I. Lipases from yeasts (Review). *Acta Biotechnology*. 1991; 11:159-167.
- HAMA, S., NUMATA, TAMALAMPUDI, S., YOSHIDA, A., NODA, H., KONDO, A., FUKUDA, H. Use of mono- and diacylglycerol lipase as immobilized fungal whole cells to convert residual partial glycerides enzymatically into fatty acid methyl esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009; 58:93–97.

- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006; 39:235-251.
- HAZARIKA, S.; GOSWAMI, P.; DUTTA, N.N.; HAZARIKA, A.K. Ethyl oleate synthesis by Porcine pancreatic lipase in organic solvents. *Chemical Engineering Journal*. 2002; 85:61-68.
- HIOL A., JONZO M.D., RUGANI N., DRUET D., SARDA L., COMEAU L.C.; Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000; 26:421-430.
- JAEGER, K.E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B.W.; COLSON, C.; HEUVEL, M. and MISSET, O. Bacterial lipases. *FEMS Microbial Reviews*. 1994; 15:29-63.
- JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002; 13:390-397.
- KADEMI A., AÏT-ABDELKADER N., FAKHREDDINE L., BARATTI J.C.; Characterization of a new thermostable esterase from the moderate thermophilic bacterium *Bacillus circulans*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2000; 10:395-401.
- KAMINI, N.R., MALA, J.G.S., PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochemistry*. 1998; 33:505-511.
- KAR, T., DELVIGNE, F., MASSON, M., DESTAIN, J., THONART P. Investigation of the effect of different extracellular factors on the lipase production by *Yarrowia lipolytica* on the basis of a scale-down approach. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2008; 35:1053–1059.

- KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J.C.; BARON, A.M.; LIMA, V.M.G.; MITCHELL, D. Non-Aqueous Biocatalysis in Heterogeneous Solvent Systems. *Food Technology and Biotechnology*. 2004; 42:279–286.
- KAWAKAMI, K., TAKAHASHI, R., SHAKERI, M., SAKAI, S. Application of a lipase-immobilized silica monolith bioreactor to the production of fatty acid methyl esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009; 57:194–197.
- KEMPKA, A. P., LIPKE, N. R., PINHEIRO, T. L. F., MENOCIN, S., TREICHEL, H., FREIRE, D. M. G., DI LUCCIO, M., OLIVEIRA, D. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2008; 31:119–125.
- KIRAN G.S., SHANMUGHAPRIYA S., JAYALAKSHMI J., SELVIN J., GANDHIMATHI R., SIVARAMAKRISHNAN S., ARUNKUMAR M., THANGAVELU T., NATARAJASEENIVASAN K.; Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057). *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2008; 31:83-492.
- LANGRAND, G., TRIANTAPHYLIDES, C. E BARATTI, J. Lipase-catalysed formation of flavor esters. *Biotechnology Letters*. 1988; 10: 549-554.
- LEE, K.; FOGLIA, T.A.; CHANG, K. Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease. *JAOCS*. 2002; 79:191-195.
- LEVY, L.M., DEHLI, J. R. GOTOR, V. Lipase-catalyzed resolution of cyclic *cis*-and *trans*- β -hydroxy esters. *Tetrahedron: Assymetry*. 2003; 14:2053-2058.
- LIU, Z., CHI, Z., WANG, L., LI, J. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential

application for the hydrolysis of edible oils. *Biochemical Engineering Journal*. 2008; 40:445–451.

- MAHADIK N.D., PUNTAMBEKAR U.S., BASTAWDE K.B., KHIRE J.M., GOKHALE D.V.; Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 2002; 38:715-721.
- MARTÍNEZ-RUIZ, A., GARCÍA, H. S., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., FAVELA-TORRES, E. Organic Phase Synthesis of Ethyl Oleate Using Lipases Produced by Solid-state Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2008; 151:393-401.
- MARÍA. P.D.; XENAKIS, A.; STAMATIS, H.; SINISTERRA, J.V. Lipase factor (LF) as a characterization parameter to explain the catalytic activity of crude lipases from *Candida rugosa*, free or immobilized in microemulsion-based organogels. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002; 35:277-283.
- MARTINS, V.G. Co-produção de lipase e biosurfactante em FES para utilização em biorremediação de oleos vegetais e hidrocarbonetos. *Quimica Nova*. 2008; 31:1942-1947.
- MAHANTA, N., GUPTA, A., KHARE, S. K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresource Technology*. 2008; 99:1729–1735.
- MENONCIN, S., DOMÍNGUES, N.M., FREIRE, D.M.G., TONIAZZO, G., CANSIAN, R.L., OLIVEIRA, J.V., DI LUCCIO, M., OLIVEIRA, D., TREICHEL, H. Study of the extraction, concentration, and partial characterization of lipases obtained from *Penicillium verrucosum* using solid-state fermentation of soybean bran, *Food and Bioprocess Technology: An International Journal*. 2009. DOI 10.1007/s11947-008-0104-8.

- MITCHELL, D.A., VON MEIEN, O.F., KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*. 2003; 13:137-147.
- NCUBE, I., READ, J. S. Evaluation of *Vernonia galamensis* lipase (acetone power) for use biotechnology. *Industrial Crops and Products*. 1995; 3:285-292.
- NELSON, L.A.; FOGLIA, T.A.; MARMER, W.N. Lipase-catalysed production of biodiesel. *Journal of American Oil Chemist's Society*. 1996; 73:1191-1195.
- 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*. 2009; 56:231-236.
- PALMA, M.B., PINTO, A.L., GOMBERT, A.K., SEITZ, K.H., KIVATINITZ, S.C.,CASTILHO, L.R., FREIRE, D.M.G. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2000; 84-86:1137-1145.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemistry Engineering Journal*. 2003; 13:81-84.
- PANDEY, A., SOCCOL, C.R. Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. Londres, *Asiatec Publishers*. 2001; 221p.
- PANDEY, A. C.R. SOCCOL, C.LARROCHE (Eds.), Current Developments in Solid-state Fermentation, Springer science/Asiatech Publishers, Inc., New York, USA/New Delhi, India. 2007; 3–12.
- PASTORE, G. M., COSTA, V. S., KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial da lipase extracelular produzida por nova cepa de *Rhizopus sp*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2003; 23:135-140.

- PATEL, R. N. Microbial / enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002; 31:804-826.
- PERSSON M., MLADENOSKA I., WEHTJE E., PATRICK ADLERCREUTZ P.; Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technolog*. 2002; 31:833–841.
- PETERS, I. I., NELSON, F. E. Factors influencing the production of by *Mycotorula lipolytica*. *Journal of Bacteriology*. 1948; 55:581-591.
- PETER, F. E PREDA, G. Characterization of pancreatic lipase substrate specificity in organic reaction media by kinetic method. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2002; 19-20:467-472.
- PINTADO, J., TORRADO, A., GONZÁLEZ, M.P.,MURADO, M.A. Optimization of nutrient concentration for citric acid production by solid-state culture of *Aspergillus niger* on polyurethane foams. *Enzyme and Microbial Technology*. 1998; 23:149-156.
- PITT, J. I., HOCKING, A. D. Fungi and food spoilage. 2. *Ed. Maryland: Aspen*. 1999; 593 p.
- PIZARRO, A. V. L., PARK, E. Y. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochemistry*. 2003; 38:1077-1082.
- RATHI, P.; GOSWAMI, V.K.; SAHAL, V.; GUPTA, R.; Statistical medium ptimization and production of a hyperthermostable lipase from *Burkholderia cepacia* in a bioreactor. *Journal of Applied Microbiology*. 2002; 93:930-936.

- RAJENDRAN, A., THANGAVELU, V. Statistical experimental design for evaluation of medium components for lipase production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233. *Food Science and Technology*. 2009; 42:985–992.
- RIGO, E., RIGONI, R. E., LODEA, P., OLIVEIRA, D., FREIRE, D. M. G., TREICHEL, H., DI LUCCIO, M. Comparison of two Lipases in the hydrolysis of oil and grease in wastewater of the swine meat industry. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2008; 47:1760-1765.
- RIGO, E. Produção e caracterização parcial de lipases com atividade de hidrólise e de síntese por fermentação em estado sólido de farelo de soja. 2009. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.
- RUIZ, A. M., GARCIA , H. S., CASTAÑEDA, G. S., TURRES, E. F. Organic phase synthesis of ethyl oleate using lipases produced by solid-state fermentation. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 2008. DOI10.1007/s12010-008-8207-2.
- RODRIGUES, D. S., CAVALCANTE, G. P., SILVA, G. F., FERREIRA, A. L. O., GONÇALVES, L. R. B. Effect of additives on the esterification activity of immobilized *Candida antarctica* lipase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008; 24:833–839.
- RODRIGUEZ, J.A., MATEOS, J.C., NUNGARAY, J., GONZÁLEZ, BHAGNAGAR, V. T., ROUSSOS, S., CORDOVA, J., BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 2006; 41:2264–2269.
- SABU, A., AUGUR, C., SWATI, C., PANDEY, A. Tannase production by *Lactobacillus* sp. ASR-S1 under solid-state fermentation, *Process Biochemistry*. 2006; 41:575–580.

- SATO, K., SUDO, S. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology – Smallscale solid-state fermentations*. 2^a edition, Washington. 1999; 61-79.
- SHAMEL, M. M. , RAMACHANDRAN, K. B., HASAN, M., AL-ZUHAIR, S. Hydrolysis of palm and olive oils by immobilised lipase using hollow fibre reactor . *Biochemical Engineering Journal*. 2007; 34:228–235.
- SHARMA, R CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 2001; 19:627-662.
- SMANIOTTO, A. Produção e caracterização parcial de uma 'lipase sintética' produzida por uma nova cepa de *Sporobolomyces ruberrimus*. 2010. *Dissertação de mestrado* em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional do Alto Uruguai das Missões Campus de Erechim, RS, Brasil.
- SINGHANIA, R., PATEL, A. K., SOCCOL, C. R., PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 2009; 44:13–18.
- SILVA C.H., PULS J., SOUZA M.V., FERREIRA FILHO E.X.; Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures *Aspergillus fumigates fresenius*. *Revista de Microbiologia*, 2000; 28:152-156.
- SILVA, M. F. Produção e caracterização parcial de lipases de *penicillium verrucosum* e *penicillium brevicompactum* utilizando como substratos torta de babaçu e farelo de mamona. 2010. *Dissertação de Mestrado* em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional do Alto Uruguai das Missões Campus de Erechim, RS, Brasil.

- SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. S.; SILVA, R. da; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. *Process Biochemistry*. 2005; 40:2885-2889.
- SUGIHARA A., VESHIMA M., SHIMADA Y., TSUNASAWO S., TOMINAGA Y.; Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Journal Biochemistry*. 1992; 112:598-603.
- SHU, C.; XU, C.; LIN, G. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*. 2006; 41:734 – 738.
- 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*. 2009; 100:1336–1342.
- TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Process Biochemistry*. 2003; 39:459-465.
- 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*. 2008; 35:1019–1025.
- TENG, Y., XU, Y., WANG, D. Changes in morphology of *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation and their effect on production of mycelium-bound lipase. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2009; 32:397–405.
- TENG, Y., XU, Y., WANG, D. Production and regulation of different lipase activities from *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation by lipids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009; 57:292–298.

- TREICHEL H, OLIVEIRA D, MAZUTTI M A, DI LUCCIO M, OLIVEIRA J V. A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*. 2010; 3:182-196.
- VAHLA, K., KAHLERTA, H., BÖTTCHER, D., WARDENGA, R., KOMORSKY-LOVRIC, S., BORNSCHEUER, U., SCHOLZ, S. A potential high-throughput method for the determination of lipase activity by potentiometric flow injection titrations. *Analytica Chimica Acta*. 2008; 610:44–49.
- 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*. 2008; 83:47–54.
- VARGAS, V.A.; DELGADO, O.D.; HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. Lipase producing micro-organisms from a Kenyan alkaline soda lake. *Biotechnology Letters*. 2004; 26:1565-1568.
- VON MEIEN, O.F., MITCHELL, D.A. A two-phase model for water and heat transfer within an intermittently-mixed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration. *Biotechnology and Bioengineering*. 2002; 79: 416-428.
- 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*. 2008; 41:30-37.
- WATANABE, N.; OTA, Y.; MINODA, Y.; YAMADA, K. Isolation and identification of alkaline lipase producing micro-organisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1977; 41:1353-1358.

- WOLSKI, E., MENUSSI, E., REMONATTO, D., VARDANEGA, R., ARBTER, F., RIGO, E., NINOW, J., MAZUTTI, M., DI LUCCIO, M., OLIVEIRA, D., TREICHEL, H. Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium sp.* in solid state and submerged fermentation: a comparative study. *LWT – Food Science and Technology*. 2009; 42:1557-1560.
- WOLSKI E., MENUSSI E., REMONATTO D., VARDANEGA R., ARBTER F., RIGO E., MAZUTTI M.A., DI LUCCIO M., NINOW J., DE OLIVEIRA D., TREICHEL H.; Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium sp.* in solid state and submerged fermentation: a comparative study. *LWT - Food Science and Technology*, 2009 ^b: doi: 10.1016/j.lwt.2009.04.006.
- XIE, W., MA, N. Immobilized Lipase on Fe₃O₄ Nanoparticles as Biocatalyst for Biodiesel Production. *Energy & Fuels*. 2009; 23:1347–1353.
- ZHU K., JUTILA A., TUOMINEN E. K. J., PATKAR S. A., SVENDSEN A., KINNUNEN P.K.; Impact of the tryptophan residues of *Humicola lanuginosa* lipase on its thermal stability. *Journal of Biochemical and Biophysical Acta*. 2001; 1547:329–38.

7. ANEXOS

Anexo I

Curva de calibração para a medida de crescimento celular

A Figura 6.2 apresenta a curva de calibração obtida para a densidade óptica (u.a.) em função da concentração celular em termos de massa celular seca (g/L).

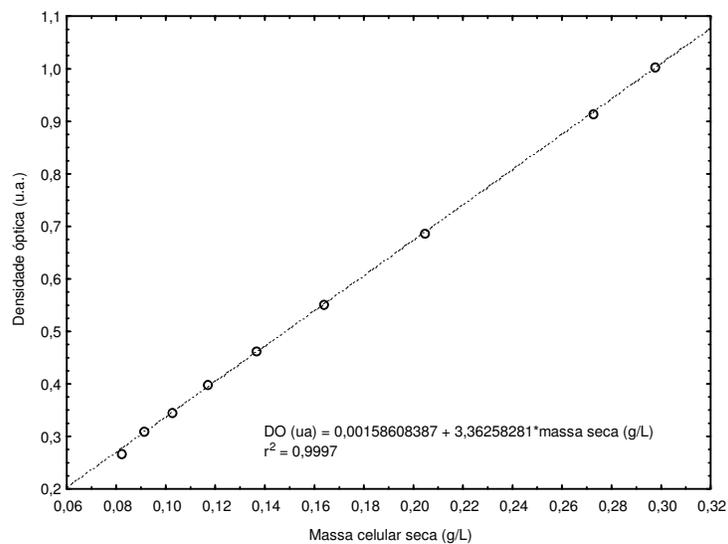


Figura 16. Curva de calibração para a medida de crescimento celular.