

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES  
URI – CAMPUS DE ERECHIM  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Christian Oliveira Reinehr

Produção de lipases de *Aspergillus* spp. por fermentação em estado sólido seguida de separação e concentração utilizando membranas

Erechim / RS

2015

Christian Oliveira Reinehr

Produção de lipases de *Aspergillus* spp. por fermentação em estado sólido seguida de separação e concentração utilizando membranas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadores: Profa. Dra. Helen Treichel, Profa. Dra. Luciane Maria Colla, Prof. Dr. Marcus Vinícius Tres, Profa. Dra. Juliana Steffens.

Erechim / RS

2015

Christian Oliveira Reinehr

Produção de lipases de *Aspergillus* spp. por fermentação em estado sólido seguida de separação e concentração utilizando membranas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadores: Profa. Dra. Helen Treichel, Profa. Dra. Luciane Maria Colla, Prof. Dr. Marcus Vinícius Tres, Profa. Dra. Juliana Steffens.

Data da defesa: 30/03/2015

Banca examinadora:

---

Profa. Dra. Helen Treichel  
Orientadora (UFFS)

---

Prof. Dr. Vandrê Barbosa Brião  
Membro da banca (UPF)

---

Profa. Dra. Luciane Maria Colla  
Orientadora (UPF)

---

Prof. Dr. João Paulo Bender  
Membro da banca (UFFS)

---

Prof. Dr. Marcus Vinícius Tres  
Orientador (UFSM)

---

Profa. Dra. Natalia Paroul  
Membro da banca (URI)

---

Profa. Dra. Juliana Steffens  
Orientadora (URI)

---

Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago  
Membro da banca (URI)

Aos meus pais  
Marilene Oliveira Reinehr e Nelson Leopoldo Reinehr,  
que sempre valorizaram e incentivaram o estudo.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), em especial aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, fundamentais para o meu aprendizado durante o curso.

À Universidade de Passo Fundo (UPF), por possibilitar o desenvolvimento da parte experimental da tese em suas dependências.

Aos meus orientadores Helen Treichel, Luciane Maria Colla, Marcus Vinícius Tres e Juliana Steffens, cada um contribuindo com suas experiências pessoais e profissionais nas diferentes etapas do trabalho.

Ao professor Vandr e Barbosa Brião, pela colaboração fundamental na etapa final do trabalho, realizada no Laboratório de Operações Unitárias da UPF.

Aos alunos e ex-alunos, bolsistas ou não, que participaram diretamente do desenvolvimento da parte experimental desta tese: Juliana Rizzardi, Aline Matuella Moreira, Luísa Bortoluzzi, Valquíria Quoos de Moraes, Graciele Cossetin Pauletti, Greice Elisabete Müller de Wolle, Tatiana Moresco Smaniotto, Lais Carteli Cidade.

Aos membros das bancas referentes ao exame de qualificação e à defesa de tese, pelas considerações, sugestões e contribuições apresentadas, viabilizando a etapa final do trabalho e melhorando a qualidade do documento.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

Por fim um agradecimento especial a Luciane Maria Colla que, além de ter sido a maior incentivadora deste trabalho,   minha esposa, mãe dos meus filhos Amanda e Arthur, minha parceira e meu amor.

Resumo da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos

## Produção de lipases de *Aspergillus* spp. por fermentação em estado sólido seguida de separação e concentração utilizando membranas

Christian Oliveira Reinehr  
2015

Orientadores: Profa. Dra. Helen Treichel, Profa. Dra. Luciane Maria Colla, Prof. Dr. Marcus Vinícius Tres, Profa. Dra. Juliana Steffens.

Lipases são enzimas aplicáveis a diversos setores industriais, podendo ser obtidas de fontes microbianas a partir de fermentação em estado sólido utilizando matrizes oriundas de resíduos agroindustriais. A separação e a concentração da enzima podem ser feitas através de vários métodos, sendo que os processos de separação por membranas apresentam vantagens sobre outras técnicas, como economia de energia, simplicidade de operação e viabilidade de uso em escala industrial. Esta tese de doutorado teve como objetivo principal desenvolver uma metodologia para se obter, separar e concentrar lipases oriundas de fermentação em estado sólido utilizando-se fungos filamentosos e resíduos agroindustriais, sendo o trabalho dividido em três etapas. Na primeira parte foi efetuado o estudo da produção de lipases com atividade de esterificação por *Aspergillus* spp. As enzimas dos fungos *A. niger* O-4 e *A. fumigatus* não apresentaram atividade de esterificação frente ao ácido láurico. As lipases de *A. niger* O-4 apresentaram maior atividade de esterificação para o ácido butírico do que para o ácido oleico, havendo também maior atividade quando o pH do meio foi de 6,2, enquanto que as lipases de *A. fumigatus* apresentaram maior atividade frente ao ácido oleico e frente ao ácido butírico. As conversões em ésteres etílicos obtidas pelas enzimas foram maiores realizando-se a produção da enzima com *A. niger* O-4 em meio de cultivo com pH 4,5. Na segunda parte desta tese foi realizada a produção de lipases com atividade de hidrólise por *Aspergillus* spp. utilizando resíduos agroindustriais (farelo de trigo e casca de arroz) e foi estudada a influência da concentração do indutor e da umidade do processo conduzido via fermentação em estado sólido. As maiores atividades de hidrólise foram obtidas com o fungo *A. niger* O-4 e com óleo de soja como indutor, sendo que tanto a umidade quanto a concentração de indutor apresentaram influência significativa na produção de lipases. A utilização de 65 % de umidade e de 2 % de óleo de soja proporcionou a obtenção de lipases com atividade de hidrólise de até 13,44 U/g para 6 dias de fermentação. Na terceira parte procedeu-se a separação e concentração das enzimas utilizando processos de separação por membranas. O uso de processos sequenciais de microfiltração e ultrafiltração possibilitaram a obtenção de concentrados com atividade de hidrólise 3 vezes superior à do extrato inicial. Os fluxos de permeado nas microfiltrações com membranas de 20  $\mu\text{m}$  e 0,45  $\mu\text{m}$  e nas ultrafiltrações com membranas de 100 kDa e 50 kDa foram superiores a 60 L/m<sup>2</sup>.h, sendo que a incrustação formada nas etapas apresentou uma natureza majoritariamente reversível, podendo ser removida por processos de limpeza. Os resultados são promissores, evidenciando a viabilidade do processo de produção de lipases de *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais, sendo necessários estudos complementares que busquem a otimização das condições de separação e concentração das enzimas por filtração tangencial.

Palavras-chave: Concentração. Enzimas. Filtração. Resíduos agroindustriais.

Abstract of Thesis presented to Food Engineering Program from Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões as a partial fulfillment of the requirements for obtaining the Degree of Doctor in Food Engineering

Production of lipases by *Aspergillus* spp. through solid state fermentation followed by separation and concentration using membranes

Christian Oliveira Reinehr  
2015

Advisors: Prof. Dr. Helen Treichel, Prof. Dr. Luciane Maria Colla, Prof. Dr. Marcus Vinícius Tres, Prof. Dr. Juliana Steffens.

Lipases are enzymes applicable for many industries and can be obtained from microbial sources through solid state fermentation using agro-industrial by-products. The separation and concentration of the enzyme can be made by several methods, and the membrane separation processes present advantages over other techniques such as power savings, simplicity of operation and feasibility of use on an industrial scale. This doctoral thesis had the aim to develop a method to produce, separate and concentrate lipases derived from solid state fermentation using filamentous fungi and agro-industrial by-products and the work is divided into three parts. In the first part it was carried out the study of lipase production with esterification activity by *Aspergillus* spp. The enzymes produced by fungi *A. niger* O-4 and *A. fumigatus* have not exhibited esterification activity against lauric acid. Lipases from *A. niger* O-4 showed higher esterification activity against butyric acid than against oleic acid, also presenting higher activity when pH of culture medium was 6.2, while lipases from *A. fumigatus* showed higher esterification activity against oleic acid and butyric acid. Conversions in ethylic esters obtained by the lipases were higher when the production of the enzyme by *A. niger* O-4 was carried out at pH 4.5. In the second part it was evaluated the lipase production with hydrolysis activity by *Aspergillus* spp. using agro-industrial by-products and it was studied the influence of the inducer concentration and the humidity of the process carried out through solid-state fermentation. The highest lipolytic activities were found with fungus *A. niger* O-4 and soybean oil as inducer, and both the moisture as the inducer concentration had significant effect on lipase production. Using 65 % moisture and 2 % soybean oil it was obtained lipase with hydrolysis activity of 13.44 U/g with 6 days of fermentation. In the third part it was analyzed the separation and concentration of enzymes using membrane separation processes. The sequential use of microfiltration and ultrafiltration processes made possible to obtain concentrates with hydrolysis activity three times higher than the initial extract. The permeate flux in microfiltration using 20  $\mu\text{m}$  and 0.45  $\mu\text{m}$  membranes and in ultrafiltration using membranes of 100 kDa and 50 kDa were higher than 60 L/m<sup>2</sup>.h, wherein the fouling formed during the filtration steps presented reversible nature, indicating that it may be removed by cleaning processes. The results are promising, showing the feasibility of the lipases production process by *Aspergillus niger* through solid state fermentation using agro-industrial by-products. Furthermore new studies are necessary to seek the optimization of conditions of separation and concentration of the enzymes by tangential filtration.

Key-words: Concentration. Enzymes. Filtration. Agro-industrial by-products.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 2.1 – Representação da lipase oriunda da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, apresentando a cavidade onde se encontra o sítio ativo (resíduos dos *pockets* ligantes em amarelo)..... 24
- Figura 2.2 – Representação esquemática dos sistemas de filtração: (a) filtração frontal ou perpendicular (*dead end filtration*), (b) filtração tangencial (*cross-flow filtration*)..... 44
- Figura 2.3 – Representação dos processos de filtração por membranas que utilizam o gradiente de pressão como força motriz..... 45
- Figura 2.4 – Diagrama esquemático dos principais tipos de módulos de filtração por membranas: (a) cartucho, (b) placa e quadro, (c) espiral enrolada, (d) tubular, (e) capilar, (f) fibra oca..... 48
- Figura 2.5 – Representação esquemática da diminuição do fluxo permeado durante o processo de ultrafiltração, com identificação das zonas: (A) queda rápida inicial do fluxo, (B) queda lenta e gradual de fluxo, (C) estado estacionário..... 52
- Figura 2.6 – Efeito da pressão no fluxo permeado em um processo de filtração tangencial ... 53
- Figura 2.7 – Mecanismos de incrustação das membranas porosas: (a) bloqueio completo de poros, (b) bloqueio interno de poros, (c) bloqueio parcial de poros, (d) formação de torta .... 55

### CAPÍTULO 3 – PRODUÇÃO DE LIPASES COM ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO POR *Aspergillus* spp. ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

- Figura 3.1 – Atividade de esterificação das enzimas liofilizadas produzidas por (a) *Aspergillus niger* O-4 e (b) *Aspergillus fumigatus*, com pH do meio de cultivo ajustado ou não e a partir de diferentes formas de obtenção da enzima liofilizada (FFL: farelo fermentado liofilizado, EL: extrato liofilizado)..... 69
- Figura 3.2 – Conversões em ésteres obtidas a partir das lipases produzidas em fermentação em estado sólido por *Aspergillus niger* O-4 e *Aspergillus fumigatus* (FFL: farelo fermentado liofilizado, EL: extrato liofilizado) ..... 72

Figura 3.3 – Cromatograma com a identificação dos ésteres etílicos produzidos a partir do experimento utilizando o extrato liofilizado obtido com o fungo <i>Aspergillus niger</i> O-4 no cultivo com pH 4,5.....	73
---	----

#### **CAPÍTULO 4 – PRODUÇÃO DE LIPASES COM ATIVIDADE DE HIDRÓLISE POR *Aspergillus* spp. ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Figura 4.1 – Efeito da emulsão e da concentração de solução tampão sobre a atividade de hidrólise das lipases do fungo <i>Aspergillus niger</i> O-4 .....	83
Figura 4.2 – Produtividade enzimática dos fungos estudados em função do tipo de indutor utilizado .....	86
Figura 4.3 – Efeito da umidade e da concentração de indutor sobre a produtividade das lipases do fungo <i>Aspergillus niger</i> O-4 durante a fermentação em estado sólido .....	89
Figura 4.4 – Produtividade das lipases do fungo <i>Aspergillus niger</i> O-4 em função da umidade e da concentração de indutor durante a fermentação em estado sólido: (a) superfície de resposta da produtividade; (b) curvas de contorno da produtividade .....	90

#### **CAPÍTULO 5 – SEPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE LIPASES DE *Aspergillus niger* UTILIZANDO MEMBRANAS**

Figura 5.1 – Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado na concentração de lipases produzidas pelo fungo <i>Aspergillus niger</i> O-4 .....	94
Figura 5.2 – Vista do módulo de bancada utilizado no processo de separação por membranas .....	95
Figura 5.3 – Retenção de proteína após os processos de microfiltração com membranas de 20 $\mu\text{m}$ (M20) e de 0,45 $\mu\text{m}$ (M0,45) e ultrafiltração com membranas de 100 kDa (U100), 50 kDa (U50) e 20 kDa (U20) .....	106
Figura 5.4 – Rendimento após os processos de microfiltração com membranas de 20 $\mu\text{m}$ (M20) e de 0,45 $\mu\text{m}$ (M0,45) e ultrafiltração com membranas de 100 kDa (U100), 50 kDa (U50) e 20 kDa (U20) .....	110

Figura 5.5 – Eletroforese das amostras iniciais e finais (R: retido, P: permeado) dos processos de microfiltração (M20 e M0,45) e ultrafiltração (U100, U50 e U20) utilizando membranas .....	113
Figura 5.6 – Curvas de fluxo permeado durante os processos de microfiltração utilizando membranas planas de (a) 20 $\mu\text{m}$ e (b) 0,45 $\mu\text{m}$ .....	115
Figura 5.7 – Curvas de fluxo permeado durante os processos de ultrafiltração utilizando membranas planas de (a) 100 kDa, (b) 50 kDa e (c) 20 kDa .....	116
Figura 5.8 – Contribuição percentual da resistência da membrana, da incrustação e do depósito sobre a resistência total dos processos de microfiltração (M20 e M0,45) e ultrafiltração (U100, U50 e U20) utilizados.....	120
Figura 5.9 – Microscopia eletrônica de varredura da superfície da membrana de microfiltração de 0,45 $\mu\text{m}$ utilizada no processo: (a) antes da filtração e (b) depois da filtração .....	122
Figura 5.10 – Microscopia eletrônica de varredura da seção transversal das membranas de ultrafiltração de: 100 kDa antes (a) e depois (b), 50 kDa antes (c) e depois (d), 20 kDa antes (e) e depois (f) do processo .....	123

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 3 – PRODUÇÃO DE LIPASES COM ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO POR *Aspergillus* spp. ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Tabela 3.1 – Planejamento fatorial misto $2^2.3^1$ utilizado para avaliar a influência do ajuste de pH do meio de cultivo, a forma de obtenção da enzima e do ácido graxo utilizado na reação de esterificação sobre a atividade de esterificação das lipases produzidas para os fungos <i>Aspergillus niger</i> O-4 e <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	63
Tabela 3.2 – Resultados do planejamento fatorial misto $2^2.3^1$ utilizado sobre a atividade de esterificação das lipases produzidas para os fungos <i>Aspergillus niger</i> O-4 e <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	67
Tabela 3.3 – Conversões em ésteres obtidas na alcoólise enzimática do óleo de soja com hexano como solvente orgânico para as lipases produzidas pelos fungos <i>Aspergillus niger</i> O-4 e <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	72

### **CAPÍTULO 4 – PRODUÇÃO DE LIPASES COM ATIVIDADE DE HIDRÓLISE POR *Aspergillus* spp. ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Tabela 4.1 – Matriz do planejamento fatorial completo $2^2$ utilizado para a padronização da metodologia para determinação da atividade de hidrólise das lipases.....	78
Tabela 4.2 – Matriz do planejamento fatorial completo $3^2$ utilizado para a seleção de fungos e indutores por fermentação em estado sólido .....	80
Tabela 4.3 – Matriz do planejamento fatorial completo $2^2$ com 3 pontos centrais utilizado na avaliação do efeito da umidade e da concentração de indutor com um dos fungos estudados	80
Tabela 4.4 – Resultados de atividade de hidrólise das lipases no estudo da padronização da metodologia utilizando o meio de cultura contendo farelo de trigo e casca de arroz.....	82
Tabela 4.5 – Análise de variância dos resultados de atividade de hidrólise para os experimentos do planejamento fatorial completo $2^2$ utilizado para a padronização da metodologia .....	82

Tabela 4.6 – Resultados de atividade de hidrólise das lipases produzidas nas condições do planejamento fatorial completo $3^2$ utilizado para a seleção de fungos e indutores por fermentação em estado sólido .....	84
Tabela 4.7 – Efeitos estimados a partir da análise de variância da produtividade enzimática em função do microrganismo e do indutor para a fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais.....	86
Tabela 4.8 – Resultados de atividade de hidrólise das lipases produzidas nas condições do planejamento fatorial completo $2^2$ com 3 pontos centrais utilizado na avaliação do efeito da umidade e da concentração do óleo de soja com o fungo <i>Aspergillus niger</i> O-4.....	87
Tabela 4.9 – Análise de variância dos resultados de produtividade para os experimentos do planejamento fatorial completo $2^2$ .....	88

## **CAPÍTULO 5 – SEPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE LIPASES DE *Aspergillus niger* UTILIZANDO MEMBRANAS**

Tabela 5.1 – Parâmetros dos processos de separação com membranas de microfiltração e ultrafiltração .....	104
Tabela 5.2 – Resultados de atividade de hidrólise das amostras em cada etapa do processo de separação sequencial por membranas .....	105
Tabela 5.3 – Resultados de atividade de esterificação das amostras em cada etapa do processo de separação sequencial por membranas.....	108
Tabela 5.4 – Permeabilidade hidráulica das membranas de microfiltração e ultrafiltração utilizando água deionizada em diferentes pressões .....	114
Tabela 5.5 – Resultados de fluxo permeado dos extratos contendo lipases e recuperação do fluxo após filtração e lavagem com água.....	118
Tabela 5.6 – Resistências calculadas para os processos de microfiltração e ultrafiltração das lipases produzidas por <i>Aspergillus niger</i> O-4 através de fermentação em estado sólido .....	119

## LISTA DE SÍMBOLOS

$A$	Atividade de hidrólise ou de esterificação (U/mL)
$A_{esp}$	Atividade específica de hidrólise ou de esterificação (U/mg)
$AE$	Atividade de esterificação (U/g ou U/mL)
$AE_{esp}$	Atividade específica de esterificação (U/mg)
$AH$	Atividade de hidrólise (U/g ou U/mL)
$AH_{esp}$	Atividade específica de hidrólise (U/mg)
$AH_{ff}$	Atividade de hidrólise no tempo final (U/g)
$AH_{ti}$	Atividade de hidrólise no tempo inicial (U/g)
$A_i$	Área correspondente a cada pico dos ésteres identificados
$API$	Área do padrão interno (C17:0)
$A_m$	Área da membrana (m <sup>2</sup> )
$A_{permeado}$	Proteína (%) ou atividade de hidrólise ou esterificação no permeado (U/mL)
$A_{retido}$	Proteína (%) ou atividade de hidrólise ou de esterificação no retido (U/mL)
$AT_{alimentação}$	Proteína (%) ou atividade total de hidrólise ou esterificação da alimentação (U)
$AT_{retido}$	Proteína (%) ou atividade total de hidrólise ou esterificação no retido (U)
$C_a$	Concentração da amostra injetada (mg/L)
$CPI$	Concentração do padrão interna na amostra injetada (mg/L)
$C_p$	Concentração de proteína na amostra (mg <sub>proteína</sub> /mL <sub>amostra</sub> )
$C_{permeado}$	Concentração do componente no permeado
$C_{retido}$	Concentração do componente no retido
$CV$	Conversão em ésteres (%)
$\Delta P$	Pressão transmembrana (kPa)
$FCV$	Fator de concentração volumétrica
$J$	Fluxo permeado (L/m <sup>2</sup> .h)
$L_p$	Permeabilidade hidráulica (L/m <sup>2</sup> .kPa.h)
$M$	Concentração molar da solução de NaOH (mol/L)
$m$	Massa de amostra (g)
$\mu$	Viscosidade do permeado (kPa.s)
$P$	Produtividade enzimática (U/d)
$R$	Retenção (%)

$R_{AE}$	Retenção da atividade de esterificação (%)
$R_{AH}$	Retenção da atividade de hidrólise (%)
$R_d$	Resistência do depósito ( $m^{-1}$ )
$R_i$	Resistência da incrustação ( $m^{-1}$ )
$R_m$	Resistência da membrana ( $m^{-1}$ )
$R_t$	Resistência total ( $m^{-1}$ )
$t$	Tempo de reação (min)
$t_f$	Tempo final (min)
$t_i$	Tempo inicial (min)
$t_m$	Tempo de filtração (h)
$V$	Volume de amostra (mL)
$V_a$	Volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL)
$V_b$	Volume de NaOH gasto na titulação do ensaio controle (mL)
$V_c$	Volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL)
$V_f$	Volume final de meio reacional (mL)
$V_e$	Volume total de extrato (mL)
$V_r$	Volume da alíquota de extrato utilizada na reação (mL)
$V_p$	Volume de permeado (L)
$V_{alimentação}$	Volume da alimentação no início de cada processo (mL)
$V_{retido}$	Volume de retido após cada processo (mL)
$Y$	Rendimento (%)

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1	OBJETIVO GERAL.....	21
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
1.3	ESTRUTURA DO TRABALHO .....	22
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>23</b>
2.1	LIPASES.....	23
2.1.1	Aplicações das lipases .....	25
2.1.1.1	<i>Indústria de alimentos.....</i>	<i>26</i>
2.1.1.2	<i>Indústria química.....</i>	<i>27</i>
2.1.1.3	<i>Tratamento de efluentes.....</i>	<i>29</i>
2.1.1.4	<i>Outras aplicações.....</i>	<i>30</i>
2.1.2	Produção de enzimas .....	30
2.1.2.1	<i>Fermentação submersa.....</i>	<i>32</i>
2.1.2.2	<i>Fermentação em estado sólido.....</i>	<i>32</i>
2.1.3	Produção de lipases por fermentação em estado sólido .....	34
2.1.3.1	<i>Efeito dos macronutrientes.....</i>	<i>34</i>
2.1.3.2	<i>Efeito dos micronutrientes.....</i>	<i>36</i>
2.1.3.3	<i>Efeito das condições ambientais.....</i>	<i>36</i>
2.1.3.4	<i>Efeito dos indutores.....</i>	<i>37</i>
2.1.3.5	<i>Efeito do inóculo.....</i>	<i>39</i>
2.1.4	Purificação das lipases.....	39
2.1.4.1	<i>Técnicas de separação e extração das lipases.....</i>	<i>40</i>
2.1.4.2	<i>Técnicas de purificação das lipases.....</i>	<i>41</i>
2.1.4.3	<i>Outras estratégias de purificação das lipases .....</i>	<i>42</i>
2.2	PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS .....	42
2.2.1	Aspectos gerais .....	42
2.2.2	Características da filtração tangencial .....	43
2.2.3	Aplicações dos processos de separação por membranas.....	45
2.2.4	Tipos de membranas.....	46
2.2.5	Tipos de módulos de separação.....	47
2.2.6	Parâmetros de processo para microfiltração e ultrafiltração.....	49

2.2.6.1	<i>Fluxo permeado</i> .....	50
2.2.6.2	<i>Permeabilidade hidráulica</i> .....	50
2.2.6.3	<i>Retenção</i> .....	51
2.2.7	Fatores limitantes da microfiltração e da ultrafiltração.....	51
2.2.7.1	<i>Polarização por concentração</i> .....	52
2.2.7.2	<i>Incrustação (fouling)</i> .....	54
2.2.8	Ultrafiltração para separação e concentração de proteínas e enzimas.....	57
2.2.8.1	<i>Concentração de lipases por membranas</i> .....	59
<b>3</b>	<b>PRODUÇÃO DE LIPASES COM ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO POR <i>Aspergillus</i> spp. ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....</b>	<b>61</b>
<b>3.1</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
3.1.1	Microrganismos e preparo do inóculo .....	61
3.1.2	Produção de lipases com atividade de esterificação e avaliação da especificidade por substrato.....	62
3.1.3	Determinação da atividade de esterificação .....	63
3.1.4	Uso das enzimas em reação de alcoólise de óleo vegetal.....	64
<b>3.2</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
3.2.1	Seleção de microrganismos produtores de lipases com atividade de esterificação .....	66
3.2.2	Avaliação da especificidade por diferentes ácidos graxos .....	67
3.2.3	Alcoólise de óleo vegetal.....	71
<b>3.3</b>	<b>CONCLUSÕES DESTA ETAPA .....</b>	<b>75</b>
<b>4</b>	<b>PRODUÇÃO DE LIPASES COM ATIVIDADE DE HIDRÓLISE POR <i>Aspergillus</i> spp. ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....</b>	<b>76</b>
<b>4.1</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>76</b>
4.1.1	Microrganismos.....	76
4.1.2	Manutenção e preparo do inóculo .....	76
4.1.3	Seleção do meio de cultivo .....	77
4.1.4	Extração das lipases.....	77
4.1.5	Padronização da metodologia para determinação da atividade de hidrólise.....	78
4.1.6	Seleção de microrganismos e indutores .....	79
4.1.7	Efeito da umidade e da concentração de indutor .....	80
4.1.8	Determinação da produtividade.....	81
<b>4.2</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>

4.2.1	Seleção do meio de cultivo .....	81
4.2.2	Padronização da metodologia para determinação da atividade de hidrólise.....	82
4.2.3	Seleção de microrganismos e indutores .....	84
4.2.4	Efeito da umidade e da concentração de indutor .....	87
<b>4.3</b>	<b>CONCLUSÕES DESTA ETAPA .....</b>	<b>91</b>
<b>5</b>	<b>SEPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE LIPASES DE <i>Aspergillus niger</i> UTILIZANDO MEMBRANAS.....</b>	<b>92</b>
<b>5.1</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>92</b>
5.1.1	Microrganismo .....	92
5.1.2	Produção de lipases através de fermentação em estado sólido.....	92
5.1.2.1	<i>Manutenção e preparo do inóculo .....</i>	<i>92</i>
5.1.2.2	<i>Produção das enzimas.....</i>	<i>93</i>
5.1.2.3	<i>Extração das enzimas.....</i>	<i>93</i>
5.1.3	Sistema de filtração com membranas .....	94
5.1.3.1	<i>Especificação do sistema.....</i>	<i>94</i>
5.1.3.2	<i>Especificação das membranas.....</i>	<i>95</i>
5.1.4	Separação e concentração das lipases produzidas por fermentação em estado sólido .....	96
5.1.4.1	<i>Microfiltração do extrato enzimático.....</i>	<i>96</i>
5.1.4.2	<i>Ultrafiltração do extrato enzimático .....</i>	<i>96</i>
5.1.5	Determinações analíticas .....	97
5.1.5.1	<i>Quantificação de proteína.....</i>	<i>97</i>
5.1.5.2	<i>Atividade de hidrólise.....</i>	<i>97</i>
5.1.5.3	<i>Atividade de esterificação.....</i>	<i>98</i>
5.1.5.4	<i>Atividade enzimática específica .....</i>	<i>99</i>
5.1.5.5	<i>Fator de concentração volumétrico .....</i>	<i>99</i>
5.1.5.6	<i>Retenção das membranas .....</i>	<i>99</i>
5.1.5.7	<i>Rendimento do processo.....</i>	<i>100</i>
5.1.5.8	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....</i>	<i>100</i>
5.1.6	Caracterização dos processos sequenciais de filtração.....	101
5.1.6.1	<i>Determinação da permeabilidade hidráulica das membranas.....</i>	<i>101</i>
5.1.6.2	<i>Avaliação dos fluxos permeados da microfiltração e da ultrafiltração.....</i>	<i>101</i>
5.1.6.3	<i>Resistências dos processos .....</i>	<i>102</i>
5.1.6.4	<i>Microscopia eletrônica de varredura das membranas.....</i>	<i>102</i>
<b>5.2</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>103</b>
5.2.1	Produção de lipases em bandejas com resíduos agroindustriais .....	103

5.2.2	Separação e concentração das lipases utilizando membranas.....	104
5.2.3	Caracterização dos processos sequenciais de filtração.....	114
<b>5.3</b>	<b>CONCLUSÕES DESTA ETAPA .....</b>	<b>124</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>126</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>127</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>128</b>
<b>9</b>	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>149</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de enzimas está em um momento de evolução, em função da melhor compreensão da estrutura de cada enzima, de seu crescente uso e da busca pela otimização dos processos de produção e purificação. O mercado industrial de aplicação de enzimas continua a crescer devido ao desenvolvimento de novas tecnologias, ao uso da engenharia genética durante a produção e à necessidade de novos campos de aplicação. O mercado global de enzimas industriais foi estimado em 3,3 bilhões de dólares em 2010 e espera-se que atinja 4,4 bilhões de dólares em 2015 (IYER; ANANTHANARAYAN, 2008; BINOD et al., 2013). Estima-se que o Brasil poderia produzir mais de  $10^7$  toneladas de amilases,  $10^7$  toneladas de celulases e  $10^8$  toneladas de lipases, se utilizasse apenas os resíduos agroindustriais renováveis disponíveis, evidenciando o potencial brasileiro para produção de enzimas a partir deste tipo de substrato (CASTRO; CASTRO, 2012).

As lipases são enzimas muito utilizadas que podem catalisar reações de hidrólise parcial ou total de triacilgliceróis em ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis, atuando também em reações de esterificação, interesterificação e transesterificação, quando em ambiente com restrição de água. Lipases são aplicáveis a diferentes setores, como indústrias de alimentos, detergentes, tecidos, polpa e papel, gorduras, óleos, tratamento de efluentes, polímeros biodegradáveis, fármacos, testes de diagnóstico, cosméticos, chás, aplicações médicas, biossensores, couro, biodiesel, como revisado por diversos autores (CONTESINI et al., 2010; TREICHEL et al., 2010; MESSIAS et al., 2011; COLLA; REINEHR; COSTA, 2012; KAPOOR; GUPTA, 2012; NAGARAJAN, 2012; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Enzimas microbianas são preferíveis para aplicações industriais em virtude dos menores tempos de geração para produção, facilidade de manipulações genéticas, aumento de escala e purificação, especificidade e estabilidade. As lipases industriais são produzidas principalmente por fungos filamentosos, em especial dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Fusarium* (PANDEY, 2003; COUTO; SANROMÁN, 2006; NAGARAJAN, 2012). A maior utilização industrial dessas enzimas, entretanto, está condicionada à diminuição dos custos de produção. Estratégias para este fim incluem a seleção de novos microrganismos produtores, bem como a utilização de meios de cultivo de baixo custo. Neste sentido, o uso da fermentação em estado sólido para a produção de lipases fúngicas é apropriado, já que pode utilizar resíduos agroindustriais na composição dos meios

de cultivo, como farelo de soja (WOLSKI et al., 2009; GRIEBELER et al., 2011), semente de mostarda (SETHI et al., 2013), amendoim, nozes, farelo de arroz, farelo de cevada (LÓPEZ et al., 2010), torta de mamona e bagaço de cana (CORADI et al., 2013).

Os fatores que podem afetar a produtividade destes bioprocessos são relacionados aos microrganismos produtores, aos tipos e concentrações de nutrientes, ao pH, à temperatura e à presença e concentração de indutores (TREICHEL et al., 2010). A realização de pesquisas que utilizam microrganismos isolados de novos ambientes, bem como a utilização de resíduos agroindustriais, como o farelo e casca de soja, farelo de trigo, casca de arroz e glicerol na composição dos meios é necessária, a fim de obterem-se elevadas produtividades a custos menores.

Após a produção das enzimas torna-se necessário efetuar a separação e purificação das mesmas. A separação e purificação de uma enzima é um dos maiores desafios da área de processos de separação, em virtude das características singulares das partículas que devem ser concentradas (VARDANEGA et al., 2013).

As enzimas industriais são tipicamente produzidas utilizando técnicas de fermentação submersa ou em estado sólido, seguidas de métodos tradicionais de recuperação de enzimas (centrifugação, pré-filtração e precipitação com agentes químicos). A centrifugação eleva a temperatura e causa desnaturação proteica, além de não possibilitar a separação de proteínas com densidades baixas. A pré-filtração frontal convencional apresenta baixo rendimento, em virtude da formação de torta no início do processo que inviabiliza o restante da operação. A precipitação envolve o uso de agentes químicos, aumentando o custo e a quantidade de resíduos (SZÉLPAL; POSER; ÁBEL, 2013).

A separação de componentes a partir de uma mistura é uma importante operação unitária. Há diversas tecnologias disponíveis para os processos de separação, com base nas propriedades físicas e químicas da mistura. Um dos processos que está se tornando cada vez mais atrativo é a separação com membranas através da filtração tangencial, em virtude do surgimento de novos tipos de membranas e da modificação de parâmetros de processos, variando a pressão, velocidade tangencial, carga eletrostática e temperatura do sistema (MARELLA; MUTHUKUMARAPPAN; METZGER, 2013).

As tecnologias de separação por membranas podem trazer diversas vantagens: economia de energia, seletividade, separação de compostos termolábeis, simplicidade de operação e de aumento de escala (STRATHMANN; GIORNO; DRIOLI, 2006). Entre as principais aplicações dos processos de separação por membranas estão: esterilização, clarificação, concentração de células, fracionamento e concentração de proteínas, recuperação

de solventes utilizados na extração de óleos, tratamento de efluentes, purificação de enzimas, dessalinização da água, entre outras diversas aplicações (BRIÃO; TAVARES, 2007; SAXENA et al., 2009; GOLUNSKI et al., 2011; MOHANTY; PURKAIT, 2012; TRES et al., 2012; MUÑOZ; CORREA-LLANTÉN; BLAMEY, 2013; TRES et al., 2014).

Apesar dos processos de filtração tangencial com membranas apresentarem diversas vantagens, faz-se necessária uma melhor avaliação dos parâmetros de processo que influenciam na formação de incrustação na membrana, a fim de otimizar o fluxo permeado e, conseqüentemente, a efetiva concentração da enzima. A utilização de processos de separação por membranas em série (microfiltração e ultrafiltração) pode propiciar uma diminuição no número de etapas de *downstream*, minimizando seus custos de produção. A produção industrial de enzimas está crescendo significativamente, exigindo melhoria na eficiência dos processos de cultivo e de purificação envolvidos na produção (SAXENA et al., 2009).

## 1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi desenvolver uma forma de produção, separação e concentração de lipases a partir de fungos filamentosos utilizando resíduos agroindustriais.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A partir do objetivo geral os objetivos específicos foram assim delineados:

- a) Produzir lipases com atividade de esterificação por fungos filamentosos via fermentação em estado sólido;
- b) Avaliar a especificidade das lipases produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* em reações de síntese;
- c) Padronizar o método para determinação da atividade de hidrólise das lipases fúngicas produzidas por fermentação em estado sólido;
- d) Selecionar indutores e investigar a influência da umidade e do indutor sobre a produção de lipases com atividade de hidrólise utilizando fungos filamentosos;
- e) Separar e concentrar as lipases de *Aspergillus niger* produzidas por fermentação em estado sólido através de microfiltração e ultrafiltração;
- f) Caracterizar os processos sequenciais de separação por membranas.

### 1.3 ESTRUTURA DO TRABALHO

Esta tese de doutorado está estruturada em capítulos da seguinte forma:

- a) **Capítulo 1:** apresenta a introdução e os objetivos da tese de doutorado.
- b) **Capítulo 2:** traz uma breve revisão da literatura, evidenciando os aspectos fundamentais sobre as lipases e os processos de separação por membranas e suas aplicações.
- c) **Capítulo 3:** mostra a metodologia e os resultados da produção de lipases com atividade de esterificação por fungos do gênero *Aspergillus* em fermentação em estado sólido. Este trabalho foi publicado na revista Química Nova em 2014, conforme apresentado no Apêndice A.
- d) **Capítulo 4:** apresenta a metodologia e os resultados da produção de lipases com atividade de hidrólise por fungos do gênero *Aspergillus* utilizando resíduos agroindustriais através de fermentação em estado sólido.
- e) **Capítulo 5:** traz a metodologia e os resultados do fracionamento e concentração das lipases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger* através de processos de separação por membranas.
- f) **Capítulo 6:** evidencia as conclusões do trabalho.
- g) **Capítulo 7:** enumera as sugestões para o desenvolvimento de outros trabalhos relacionados à área.
- h) **Capítulo 8:** mostra as referências bibliográficas utilizadas na tese.
- i) **Capítulo 9:** traz o apêndice do trabalho, através do artigo publicado referente ao Capítulo 3 desta tese.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 LIPASES

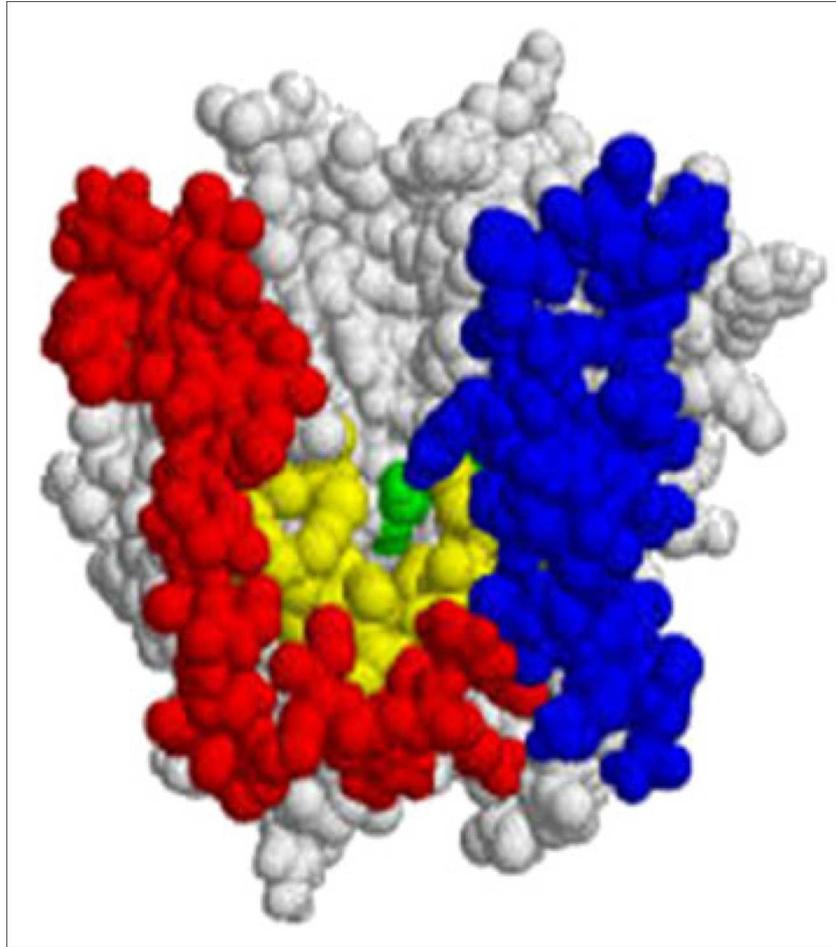
As lipases (triacilglicerol hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são uma classe de hidrolases que atuam em ligações éster do grupo carboxílico, tais como reações de esterificação, interesterificação e transesterificação em meios não aquosos, acilação de mentóis e glicóis e síntese de peptídios (NAGARAJAN, 2012). A função fisiológica das lipases é a hidrólise dos triacilgliceróis em diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ácidos graxos livres e glicerol. Em organismos eucarióticos as lipases estão envolvidas em vários estágios do metabolismo de lipídios, incluindo a digestão, absorção, reconstituição de gorduras e o metabolismo de lipoproteínas. Em plantas, as lipases são encontradas em tecidos de reserva de energia (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

A capacidade das lipases de promoverem reações químicas específicas levou a um aumento considerável no número de estudos relacionados às suas aplicações industriais, como nas áreas de alimentos, química e farmacêutica. As lipases microbianas são glicoproteínas de peso molecular variando entre 20 kDa e 80 kDa, apresentando em torno de 250 e 550 resíduos de aminoácidos, dos quais um grande número é hidrofóbico e responsável pela interação entre a enzima e os substratos insolúveis em água (TREICHEL et al., 2010; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

O sítio ativo das lipases (Figura 2.1) fica localizado dentro de uma cavidade hidrofóbica que pode ser superficial ou profunda, de acordo com a homologia a que pertencem. Nesta cavidade se aloja o ácido graxo, de modo a posicionar a ligação éster alinhada com o sítio ativo. Essa cavidade é geralmente protegida pelos resíduos polipeptídicos que se abrem, expondo o sítio ativo, quando a lipase se encontra na interface polar/apolar. Isso explica porque a grande maioria das lipases tem sua atividade aumentada sobre substratos insolúveis em água, na interface óleo/água (HOUDE et al., 2004).

Com isso as lipases tornam-se biocatalisadores em diferentes áreas, devido à possibilidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio hidrofóbico. A capacidade de utilização de substratos, a sua estabilidade frente a temperatura, pH e solventes orgânicos, regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade, são algumas características deste tipo de enzima (PANDEY et al., 1999; PINHEIRO, 2006).

Figura 2.1 – Representação da lipase oriunda da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, apresentando a cavidade onde se encontra o sítio ativo (resíduos dos *pockets* ligantes em amarelo)



Fonte: Nagarajan (2012).

As enzimas lipolíticas podem apresentar diferentes tipos de especificidades, tais como de substrato e posicional. A especificidade pelo substrato se refere a diferentes taxas de atividades enzimáticas apresentadas por uma mesma lipase sobre triacilgliceróis, diacilgliceróis e monoacilgliceróis, contendo ácidos graxos de cadeia longa ou curta. A especificidade posicional é proporcionada pela capacidade em hidrolisar ésteres primários e secundários, com ou sem especificidade. A especificidade posicional em relação ao ácido graxo tem grande importância no emprego das enzimas lipolíticas na produção de ácidos graxos livres, a partir de gorduras e óleos, nas reações de interesterificação e na esterificação de ácidos graxos por álcoois (NAGARAJAN, 2012).

Quanto à especificidade das lipases em relação ao substrato, de acordo com Yahya, Anderson e Moo-Young (1998) pode-se classificá-las em três grupos:

- a) Lipases regioseletivas, subdivididas em lipases inespecíficas e lipases 1,3 específicas. A primeira hidrolisa moléculas de acilgliceróis em posições aleatórias, produzindo ácidos graxos livres e glicerol com mono e diacilgliceróis como intermediários. A segunda catalisa a liberação de ácidos graxos nas posições 1 e 3 do glicerol.
- b) Lipases seletivas com relação ao tamanho da cadeia carbônica e/ou ao número de insaturações do grupo acila.
- c) Lipases que catalisam derivatização enantiosseletiva de compostos quirais e uma série de reações de esterificação, transesterificação e interesterificação.

O solvente pode alterar a especificidade, quimiosseletividade, regioseletividade, seletividade proquiral e enantiosseletividade das lipases e outras hidrolases. Os modelos para explicar a mudança da seletividade destas enzimas em função do solvente foram baseados na alteração da flexibilidade conformacional do sítio ativo, na partição de grupos funcionais do substrato ou de moléculas de solvente para fora ou para dentro das cavidades do sítio ativo e na estrutura do solvente. No caso de duas lipases serem produzidas por diferentes microrganismos, mesmo que elas sejam capazes de catalisar a mesma reação, ainda assim podem diferir no desempenho sob as mesmas condições de reação (YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998).

### **2.1.1 Aplicações das lipases**

As lipases são um grupo de enzimas biotecnologicamente importantes em virtude de sua versatilidade e propriedades para diferentes aplicações. As lipases podem ser utilizadas de duas formas principais: para catálise biológica com o objetivo de produzir componentes químicos importantes para as diferentes indústrias; para acelerar a degradação de resíduos gordurosos (COLLA; REINEHR; COSTA, 2012; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Diversos estudos demonstram as aplicações das lipases em situações distintas. Em resumo essas enzimas podem ser utilizadas na indústria de alimentos (KIM; YOUN; SHIN, 2006; ARAVINDAN; ANBUMATHI; VIRUTHAGIRI, 2007; RADZI et al., 2011; THAKUR; KUMAR; KANWAR, 2012), na indústria química (SILVA; CONTESINI; CARVALHO, 2008; CHAKRABORTY et al., 2010; PILISSÃO; CARVALHO; NASCIMENTO, 2012; BAI et al., 2013; MACARIO; GIORDANO, 2013), no tratamento de efluentes (CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004; MENDES; CASTRO, 2005; ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010; DORS et al., 2013), na indústria têxtil (HASAN; SHAH;

HAMEED, 2006), na indústria farmacêutica (GHORAI et al., 2009; GHORAI; SHUKLA; BHATTACHARYYA, 2012), entre outras possíveis aplicações.

#### 2.1.1.1 Indústria de alimentos

Na indústria de alimentos as lipases apresentam aplicações na síntese de emulsificantes (KIM; YOUN; SHIN, 2006), no aumento dos teores de ácidos graxos insaturados em lipídios (CARVALHO et al., 2003), na produção de margarinas, no desenvolvimento de aromas, na maturação de queijos (DUPUIS; CORRE; BOYAVAL, 1993), entre outros.

A modificação de óleos e gorduras é uma das áreas de grande crescimento na indústria de alimentos, demandando novas tecnologias. Óleos vegetais modificados estruturalmente de forma a apresentarem triacilgliceróis estruturados de importância nutricional e propriedades físico-químicas alteradas apresentam um grande potencial de mercado. Óleos com baixo custo podem ser transformados em produtos de maior valor agregado tais como triacilgliceróis de baixa caloria e óleos enriquecidos em ácido oleico (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

As lipases são utilizadas no processamento do ácido gama linolênico, astaxantina (corante alimentício), metilcetonas (moléculas características de flavor em queijos azuis), modificação de óleos vegetais na posição 2 do triacilglicerol, a fim de obter gorduras similares à gordura do leite humano para alimentação infantil, e para a produção de monoacilgliceróis para uso como emulsificante nas indústrias alimentícia e farmacêutica (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; CARVALHO et al., 2003).

A interesterificação e a hidrogenação são técnicas que têm sido utilizadas para a preparação de gliceróis para fabricação de manteigas e margarinas. A reação de interesterificação convencional é conduzida na presença de catalisadores como o hidróxido de sódio, não sendo seletiva com respeito à esterificação dos ácidos graxos em uma posição respectiva no glicerol. A reação conduzida com lipases como catalisadores é muito mais específica, no entanto requer meio aquoso, o que diminui o rendimento da reação (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

As lipases têm sido utilizadas para a síntese de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta e álcoois, os quais são compostos voláteis responsáveis por características de odor em alimentos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Por exemplo, a produção de butil acetato, o qual possui aroma de abacaxi, pode ser realizada pela reação de esterificação entre butanol e ácido acético catalisada por lipases extraídas de *Rhizopus oryzae* (SALAH; GHAMGHUI;

MILED, 2007). Similarmente, Habulin et al. (2007) citam a utilização de lipases de *Candida antarctica* na produção de ésteres de terpenos, os quais são utilizados como aromatizantes frutais em bebidas e alimentos.

A produção de aromas em produtos lácteos é acelerada quando há a formação de ácidos graxos livres e peptídios solúveis e aminoácidos durante a maturação do produto. As lipases têm sido utilizadas para a produção destes aromas. A hidrólise da gordura do leite promovida pelas lipases ocasiona a produção de compostos característicos de aromas em queijos, acelerando a maturação destes e possibilitando a produção de produtos similares a queijos e a lipólise da manteiga e do creme de leite. Os ácidos graxos livres gerados pela ação das lipases sobre a gordura do leite permitem o desenvolvimento de inúmeros novos produtos como os queijos leves, que apresentam características próprias de aroma, geradas pela produção de ácidos graxos de cadeia curta, os quais podem ser metabolizados por microrganismos e transformados em compostos como álcoois, cetonas, ésteres e lactonas (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; MESSIAS et al., 2011).

#### 2.1.1.2 Indústria química

Um dos campos de maior aplicação industrial das lipases é a indústria de detergentes. O poder de limpeza dos detergentes é aumentado pela adição de enzimas em sua composição, como amilases, proteases, celulasas e lipases (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Para uso em detergentes, as lipases precisam ser termoestáveis e permanecerem ativas em meios alcalinos, uma vez que precisam atuar em condições de lavagem com pH entre 10 e 11 e temperatura entre 30 °C e 60 °C. Além disso, devem apresentar uma baixa especificidade pelo substrato, habilidade para hidrolisar gorduras de várias composições e estabilidade aos compostos das fórmulas dos detergentes, como benzeno sulfonatos e proteases (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Estudos têm mostrado a possibilidade de produzir lipases com elevada atividade em pH alcalino (até 13,0) e com estabilidade frente a agentes surfactantes e oxidantes, viabilizando sua aplicação (MITIDIARI et al., 2006; CHERIF et al., 2011).

A produção de biodiesel tem sido citada como uma das possíveis aplicações das lipases (OLIVEIRA et al., 2005; DIZGE; KESKINLER, 2008; ANTCZAK et al., 2009; BAJAJ et al., 2010; BHARTI et al., 2013). O biodiesel ganha importância nos tempos atuais devido à possibilidade de substituição de combustíveis fósseis. Os problemas ambientais relacionados com a emissão de gases decorrente do uso de combustíveis fósseis têm impulsionado pesquisas no sentido de desenvolvimento de combustíveis alternativos como o

biodiesel (DIZGE; KESKINLER, 2008). O biodiesel (ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos) é produzido pela transesterificação de triacilgliceróis. O processo de produção comercial de biodiesel é fundamentalmente realizado por via química, mas a rota enzimática tem despertado grande interesse na comunidade científica. Um aspecto comum a estes processos é a busca pela otimização das condições de reação, de modo a lhes conferir características que os tornem viáveis e disponíveis para aplicações industriais. Entretanto, dentre algumas desvantagens essencialmente econômicas, o processo enzimático, uma vez otimizado, poderá apresentar vantagens em relação ao processo químico, tais como: a facilidade de separação do catalisador; a obtenção de produtos mais puros e por permitir o uso de etanol hidratado na reação. O uso da nanobiotecnologia, a fim de imobilizar e estabilizar as lipases microbianas, pode possibilitar o desenvolvimento de biorreatores mais eficientes para a produção de biodiesel em maior escala (VERMA; BARROW; PURI, 2013).

As lipases também têm sido utilizadas na síntese orgânica de lactonas, monoacilgliceróis, resolução de aminas, ácidos e álcoois racêmicos, e na síntese de ésteres de ácidos graxos, os quais apresentam propriedades surfactantes, com aplicações em produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; PAULA; BARBOSA; CASTRO, 2005). Produtos como triacilgliceróis, fosfolipídios, esteroides, aromatizantes e fragrâncias, apresentam em comum uma ligação éster, apesar das diferentes propriedades físicas e diversas estruturas químicas. Sabeder, Habulin e Knez (2006) utilizaram lipases de *Candida antarctica* na produção de ésteres de frutose, os quais se caracterizam como surfactantes não-iônicos com elevado potencial emulsificante, estabilizante e detergente. Os ésteres de açúcares apresentam-se como bons emulsificantes para aplicações em emulsões do tipo água em óleo em produtos alimentícios, além de poderem atuar como agentes antibacterianos aplicáveis como aditivos alimentares.

O emprego das lipases imobilizadas em reações de esterificação e transesterificação em solventes orgânicos tem sido utilizado para a produção de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta, os quais apresentam aplicações como flavorizantes, como relatado em trabalho de revisão de Dalla-Vecchia, Nascimento e Soldi (2004) e obtido experimentalmente por Salah, Ghamghui e Miled (2007), que realizaram a produção de butil acetato através da lipase produzida por *Rhizopus oryzae*. Kittikun, Kaewthong e Cheirsilp (2008) investigaram a produção de monoacilgliceróis a partir de oleína de palma com a lipase obtida por *Pseudomonas* sp., sendo que os monoacilgliceróis são os emulsificantes mais utilizados na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos.

### 2.1.1.3 Tratamento de efluentes

A utilização de enzimas no tratamento de despejos industriais foi proposta em 1930. Entretanto, só recentemente seu desenvolvimento como alternativa ao tratamento convencional de efluentes tem despertado grande interesse de pesquisa, em função das vantagens apresentadas, entre as quais podem ser citadas: o aumento da taxa de introdução no ambiente de poluentes orgânicos estranhos aos microrganismos e recalcitrantes, o que diminui as possibilidades de se realizar um tratamento convencional biológico ou químico que seja eficiente. Há um crescente reconhecimento da capacidade das enzimas para atuar sobre poluentes específicos no tratamento. Avanços recentes na biotecnologia permitiram a produção de algumas enzimas técnicas e economicamente viáveis, devido ao desenvolvimento dos procedimentos de isolamento e de purificação de microrganismos (MENDES; CASTRO, 2005).

Os efluentes industriais gerados em frigoríficos, laticínios e indústrias de alimentos em geral possuem elevados valores de demanda bioquímica e química de oxigênio (DBO e DQO), tendo em vista que o conteúdo de gorduras aumenta a concentração de matéria orgânica. Neste contexto, processos alternativos que visam à recuperação ou diminuição da carga de gorduras em efluentes são de interesse para a indústria. Um tratamento preliminar desses efluentes por meio da ação das lipases pode reduzir o diâmetro das partículas de gorduras em até 60 %, diminuindo também o teor de lipídios e o tempo de residência do efluente nas lagoas de estabilização (CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004).

As lipases de leveduras e de fungos filamentosos podem ser utilizadas em lodo ativado e outros processos aeróbicos com camadas finas de óleos constantemente removidas da superfície de tanques aerados para permitir o transporte de oxigênio (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). As lipases também podem ser diretamente aplicadas na forma bruta (caldo fermentado) ou isoladas para promover um pré-tratamento do efluente antes da digestão anaeróbia. Entretanto, estudos têm sido realizados para verificar a possibilidade de cultivo de microrganismos produtores de lipases do gênero *Penicillium* em associação com a digestão do efluente de extração de azeite de oliva (CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004).

Em estudo realizado por Roveda, Hemkemeier e Colla (2010) foram isolados, a partir de efluentes de indústrias de laticínios, diversos fungos filamentosos produtores de lipases, indicando a possibilidade de produção de enzimas a partir desse tipo de efluente e também o seu tratamento posterior, com custos menores.

#### 2.1.1.4 Outras aplicações

O uso de lipases na indústria têxtil vem crescendo em virtude da possibilidade de remoção de lubrificantes objetivando obter uma melhor absorção dos corantes nos tecidos. As lipases reduzem também o número de defeitos causados pelo sistema de abrasão durante o processo de degomagem para produção de roupas jeans (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Na indústria farmacêutica as lipases microbianas apresentam várias vantagens sobre os catalisadores químicos, incluindo a diminuição do efeito de isomerização e reações de rearranjo, além da possibilidade de economia do processo de produção. Uma das principais aplicações das lipases para a indústria farmacêutica é a produção de lactonas sintéticas, as quais não apresentam atividade citotóxica (o que ocorre com as lactonas isoladas de microrganismos) (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Outra aplicação importante é o uso terapêutico no tratamento de insuficiência pancreática, cuja suplementação é feita com enzimas. Em virtude das lipases de fontes animais serem inativadas em pH baixo, a produção de lipases microbianas estáveis em pH ácido representa uma alternativa para esse tratamento. As lipases também podem ser usadas como ferramentas de diagnóstico, indicando doenças relacionadas ao pâncreas (NAGARAJAN, 2012; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

#### 2.1.2 Produção de enzimas

As enzimas podem ser produzidas por fermentação em estado sólido (FES) e por fermentação submersa (FS). Muitos fungos filamentosos são capazes de crescer e produzir lipases com elevada atividade por fermentação em estado sólido, quando adaptado às condições ambientais. As enzimas de interesse industrial, em especial as lipases, eram produzidas tradicionalmente por fermentação submersa, entretanto estudos e pesquisas com a fermentação em estado sólido vêm crescendo nas últimas décadas, podendo ser uma alternativa muito interessante quando se utiliza como meio de fermentação um resíduo de baixo custo (CASTRO; CASTRO, 2012).

A produção de enzimas pode ser extracelular ou intracelular, no entanto a produção extracelular apresenta como vantagens a não necessidade de promover a quebra da célula, técnica difícil de ser realizada na produção em grande escala. Outra vantagem seria que apenas um número limitado de proteínas é secretado facilitando o isolamento da enzima desejada. No caso de enzimas intracelulares, o processo de isolamento torna-se mais oneroso

devido à presença de proteínas e materiais contaminantes, como ácidos nucleicos. Também deve ser ressaltado que as enzimas extracelulares apresentam uma estrutura robusta em relação às intracelulares, além de serem menos susceptíveis as desnaturações (PIETROBON, 2008).

As enzimas extracelulares podem ser induzidas, parcialmente induzidas ou constitutivas (quando a enzima é produzida constantemente, sob qualquer condição fisiológica). Essas enzimas promovem a hidrólise de moléculas poliméricas, as quais são muito grandes para entrarem na célula diretamente gerando, assim, compostos de baixo peso molecular. Esses compostos são capazes de entrar na célula e induzir a produção da enzima. Como exemplo desse mecanismo pode ser citada a síntese do complexo enzimático da celulase por *Trichoderma viride*, o qual é induzido por celulose, porém a celobiose é considerada um indutor pobre. Já a sofrose apresenta uma hidrólise mais lenta e é considerada um efetivo indutor do complexo enzimático das celulasas (PIETROBON, 2008).

Pietrobon (2008) afirmou que, indiferentemente da enzima ser constitutiva ou induzida, existe um mecanismo de controle que opera reprimindo a síntese de várias enzimas quando, no meio de cultivo em que o microrganismo se encontra, ocorra a presença de fonte de carbono prontamente assimilável. Com isso o microrganismo pode utilizar o composto necessário sem promover dispêndio de energia para a produção de enzimas que seriam utilizadas para degradar fontes de carbono mais complexas. A repressão catabólica é uma característica comum dos microrganismos capaz de afetar muitas enzimas. Outra forma de repressão das enzimas é na qual a síntese de enzimas biossintéticas endocelulares controla a produção de enzimas extracelulares. Como exemplo tem-se a secreção da enzima constitutiva protease, sendo reprimida por uma combinação de aminoácidos.

Os bioprocessos, ou ainda, processos fermentativos (sem que essa definição remonte ao significado bioquímico do termo fermentação, restrito aos processos realizados em anaerobiose), podem substituir processos puramente químicos, de síntese orgânica, no entanto, aqueles que utilizam escala industrial geralmente dependem da capacidade do microrganismo responsável em proporcionar bom e regular rendimento econômico do produto, a partir de um substrato barato e disponível. Também dependem da facilidade de recuperação ou obtenção do produto visado, sob a forma pura ou conforme o caso, pronta para o uso e ainda da impossibilidade ou dificuldade de se obter o produto através de outros processos (REGULY, 2000).

### 2.1.2.1 *Fermentação submersa*

Os processos submersos consistem naqueles em que o microrganismo é introduzido em um meio líquido na forma de um inóculo, sendo o meio contido em fermentadores providos de agitação, aeração (para microrganismos aeróbios) e outros controles, tais como: medidores de pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, entre outros (REGULY, 2000).

A fermentação submersa consiste de um meio fermentativo líquido, com nutrientes solúveis e é uma das metodologias mais usadas para a produção de enzimas. Tal técnica possui facilidade de cultivo em grande escala, homogeneidade do meio e facilidade no controle do processo. Pela maior quantidade de água desse processo há a maior probabilidade de contaminação. Os nutrientes encontram-se dissolvidos no meio líquido e por tal razão tornam-se de fácil acesso para a utilização pelos microrganismos (GUTARRA, 2003; PANDEY, 2003).

### 2.1.2.2 *Fermentação em estado sólido*

A fermentação em estado sólido é definida como um processo no qual o crescimento microbiano e a formação de produto ocorrem na superfície de substratos sólidos e em baixa atividade de água. O processo em meio sólido é bastante característico e utiliza substratos insolúveis com baixas porcentagens de água em sua composição, os quais devem atuar como suporte fisiológico e fonte de nutrientes (PEREIRA JÚNIOR; BOM; FERRARA, 2008).

A fermentação em estado sólido possui um grande potencial para produção de enzimas. Devido a sua rica natureza orgânica, os resíduos agroindustriais podem servir como um substrato ideal para processos microbianos no desenvolvimento de produtos com alto valor agregado. Estes resíduos fornecem não somente os nutrientes para cultura, mas também servem como suporte das células microbianas (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

Uma característica da fermentação em estado sólido é a dificuldade nas medidas dos parâmetros como aeração, pH, temperatura e umidade, devido à baixa homogeneidade do meio. Entretanto, apresenta como vantagens o baixo custo das matérias-primas, a simplicidade do meio e a menor probabilidade de contaminação, devido a menor quantidade de água presente (PANDEY, 2003).

Uma das principais vantagens da fermentação em estado sólido é a utilização de meios de cultura, compostos de materiais de origem vegetal. Os substratos tradicionalmente

utilizados constituem-se em produtos agrícolas como o arroz, o trigo, a cevada, o milho e a soja, além de substratos não convencionais como os resíduos agroindustriais e florestais, destacando-se: o bagaço de cana-de-açúcar, o sabugo de milho, o farelo de trigo e a palha de arroz. Estes resíduos tem despertado grande interesse da comunidade científica e industrial pela possibilidade de seu uso como matérias-primas para bioconversões. O grande interesse decorre do fato de não possuírem custos de produção associados diretamente, sendo uma forma de se agregar valor a resíduos que se formam em abundância nos setores agrícolas (PEREIRA JÚNIOR; BOM; FERRARA, 2008).

Os microrganismos utilizados nos processos de fermentação em estado sólido são capazes de crescer em baixa atividade de água, principalmente fungos e leveduras. Os fungos filamentosos são o grupo mais importante de microrganismos na fermentação em estado sólido, devido às suas propriedades fisiológicas, enzimáticas e bioquímicas (PANDEY, 2003).

Segundo Schmidell et al. (2001), pode-se citar também como vantagem da fermentação em estado sólido a aceleração na taxa de reação, devido ao direto contato entre o substrato e o microrganismo. Devido a menor quantidade de água utilizada, os reatores são menores, ocupando menores áreas, necessitando de menor investimento, reduzindo os custos com energia. A aeração forçada ou natural é facilmente acessível aos microrganismos devido à porosidade do meio. Os baixos teores de umidade aliado as elevadas concentrações iniciais de inóculo reduzem a contaminação por microrganismos indesejáveis. A recuperação do produto é facilitada devido a este estar concentrado no meio fermentado, diminuindo custos com solventes na etapa de extração.

O processo apresenta algumas limitações, pois dependendo das características do meio e do tipo de reator empregado, pode haver dificuldade em dissipar tanto o calor produzido como os gases gerados durante o processo, o que irá conduzir para a elevação da temperatura em pontos localizados, resultando em quedas no rendimento. Devido à heterogeneidade do substrato, a dissipação de calor e gases gerados, manipulação do meio, do produto final, do monitoramento e controle do processo, poderá haver dificuldades intrínsecas quando se desejar realizar a ampliação de escala (SCHMIDELL et al., 2001).

O controle dos parâmetros do processo, como pH, temperatura, umidade, aeração e crescimento dos microrganismos é mais complicado de ser feito na fermentação em estado sólido, como também a coleta de amostras representativas durante o processo. Há necessidade de controle da assepsia quando utilizados os fungos filamentosos como produtores de esporos, para evitar a contaminação (SCHMIDELL et al., 2001).

### 2.1.3 Produção de lipases por fermentação em estado sólido

As lipases podem ser produzidas por diversos tipos de plantas, animais e microrganismos. As lipases de origem microbiana, como de bactérias, fungos filamentosos e leveduras representam a classe de enzimas mais usada para aplicações biotecnológicas (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; TREICHEL et al., 2010). Os principais microrganismos produtores de lipases são:

- a) Fungos filamentosos: *Penicillium*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, entre outros;
- b) Leveduras: *Candida*, *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, entre outras;
- c) Bactérias: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, entre outras.

As lipases microbianas são produzidas tanto em cultivos submersos quanto através de fermentação em estado sólido (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001), sendo que muitos autores mencionam os processos em estado sólido como uma alternativa viável para a produção de enzimas microbianas devido à simplicidade e economia do processo (HAQ; IDREES; RAJOKA, 2002).

As células imobilizadas têm sido utilizadas em alguns casos. Muitos estudos têm sido realizados a fim de definir as condições ótimas e os requerimentos nutricionais para a produção de lipases (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

A produção de lipases pode ser influenciada pelo tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio, pela presença de micronutrientes, pelas condições ambientais (umidade, pH do meio, temperatura e disponibilidade de oxigênio) (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001), pela presença de indutores (COLLA, 2009) e pelas características do inóculo (PAPAGIANNI; MOO-YOUNG, 2002).

#### 2.1.3.1 Efeito dos macronutrientes

A síntese de enzimas por fermentação em estado sólido é realizada utilizando-se, principalmente, resíduos agroindustriais, tais como farelo de trigo, sabugo de milho, casca de manga, torta de babaçu, farelo de amendoim, dentre outros. Estes resíduos podem, em alguns casos, apresentar tanto a função de suporte para crescimento do microrganismo, como fonte de carbono e/ou indutor para a síntese enzimática. O resíduo pode ser também utilizado apenas como suporte do crescimento dos fungos (DAMASO et al., 2005).

As fontes de carbono simples como glicose, galactose, frutose, xilose, sacarose, glicerol, sorbitol e manitol foram utilizadas por Lin, Wang e Sung (2006) para a produção de lipases por *Antrodia cinnamomea*, um basidiomiceto, em processos submersos. Os resultados mais expressivos foram atingidos com os álcoois, de 26,69 mU/mL para o glicerol, 10,70 mU/mL para o sorbitol e 8,25 mU/mL para o manitol. Dalmau et al. (2000) reportaram que a produção de lipases por espécies de *Candida* é inibida na presença de açúcares simples.

Haq, Idrees e Rajoka (2002) investigaram a produção de lipases por fungos através de fermentação em estado sólido. Os microrganismos testados foram *Rhizopus oryzae*, *Mucor lipolytica*, *Rhizopus oligosporous*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus nigricans*, *Rhizopus arrhizum* e *Aspergillus wentii*. Dentre estes, o *R. oligosporous*, com 30 U/g, apresentou a máxima atividade lipolítica nos testes preliminares. Como substratos para a produção de lipases foram testadas as farinhas de amêndoa, coco, mostarda e soja, a casca de arroz e o farelo de trigo. Os melhores resultados foram obtidos com a farinha de amêndoas, devido apresentar o maior percentual de óleos dentre as fontes de carbono estudadas, bem como por ser fonte adequada de proteínas, carboidratos e cinzas.

Cordova et al. (1998) estudaram a produção de lipases em fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar e torta de oliva (um resíduo do processo de extração de azeite de oliva) como substratos. A torta de oliva e o bagaço de cana apresentaram efeito sinérgico na produção de lipases, demonstrando que substratos de baixo custo, considerados resíduos, podem ser utilizados para este fim.

As fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas podem ser utilizadas para a produção de lipases. As fontes orgânicas podem ser a peptona, água de maceração de milho, farinha de soja, aminoácidos, triptona, extrato de levedura e ureia. As fontes inorgânicas como os sais de amônio (sulfatos, fosfatos, cloretos), nitratos e nitritos podem ser utilizados, embora os melhores rendimentos em lipases tenham sido obtidos através de fontes orgânicas de nitrogênio, tais como peptona, extrato de levedura e torta de soja. O sulfato de amônio apresentou resultados negativos em alguns trabalhos. Entretanto, a produção de lipases foi incrementada quando o sulfato de amônio foi associado a fontes de nitrogênio orgânicas (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Em estudo realizado para produzir lipases em fermentação submersa pelo basidiomiceto *Antrodia cinnamomea* foram utilizadas diferentes fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas. As fontes comparadas foram adicionadas ao meio na concentração de 0,5 %, sendo elas: triptona, peptona, caseína, glicina, prolina, glutamina, asparagina, cloreto de amônio, sulfato de amônio, oxalato de amônio, acetato de amônio, nitratos de sódio e

potássio e nitrito de sódio. Os resultados mais expressivos foram obtidos com os aminoácidos asparagina (6,41 mU/mL), glicina (5,36 mU/mL) e glutamina (4,74 mU/mL) e com a triptona (4,77 mU/mL) (LIN; WANG; SUNG, 2006).

### 2.1.3.2 Efeito dos micronutrientes

Os elementos traços desempenham importante papel como constituintes de enzimas e coenzimas e são geralmente necessários nos meios de cultura para a produção de enzimas por microrganismos. A suplementação dos meios de cultivo com uma solução de minerais contendo  $ZnSO_4$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ,  $H_3BO_3$  e  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  pode ocasionar aumento na atividade enzimática dos meios contendo os óleos de gergelim, oliva de milho. Embora íons como  $Mg^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mn^{+2}$  e  $Zn^{+2}$  pareçam influenciar positivamente a produção de lipases (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001), há resultados divergentes, como os de Lin, Wang e Sung (2006), que reportaram que a adição dos íons  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Na^+$  e  $K^+$  aumentou a produção de lipase pelo fungo *Antrodia cinnamomea*, mas os íons  $Cu^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  e  $Li^+$  apresentaram efeito inibitório na produção da enzima.

### 2.1.3.3 Efeito das condições ambientais

A água é fundamental para qualquer bioprocessamento, sendo responsável pela difusão de solutos, gases e metabólitos. Para os processos submersos há água disponível abundante para o crescimento microbiano. Quando o bioprocessamento é realizado em estado sólido deve-se observar se o substrato possui umidade suficiente para permitir a manutenção das propriedades funcionais do microrganismo. Em geral para o crescimento de *Aspergillus niger* verifica-se que teores de umidade abaixo 40 % ou acima de 70 % são desfavoráveis ao desenvolvimento celular, sendo obtido maior desenvolvimento fúngico e produção de lipases com umidade em torno de 60 % (DUTRA et al., 2008; COLLA, 2009).

Haq, Idrees e Rajoka (2002) estudaram temperaturas de cultivo de 25 °C a 45 °C para a produção de lipases pelo microrganismo *R. oligosporous* por fermentação em estado sólido. Os resultados mais expressivos foram obtidos a 30 °C. Em altas e baixas temperaturas a energia requerida para a manutenção do microrganismo aumenta, diminuindo a formação de produtos. O pH inicial ótimo dos cultivos foi de 6,0. Os pHs iniciais de 5,5; 8,0 e 7,0 foram reportados como ótimos para os cultivos de *A. cinnamomea*, *R. glutinis* e *C. rugosa*,

respectivamente (LIN; WANG; SUNG, 2006). As temperaturas na faixa de 26,5 °C a 32 °C foram utilizadas em inúmeros trabalhos de pesquisa de produção de lipases, sendo 30 °C a temperatura utilizada com maior frequência. Os microrganismos utilizados variaram entre fungos, leveduras e bactérias. Quanto ao pH, foram utilizados pHs entre 6,0 e 7,0 na maioria dos trabalhos revisados (BURKERT; MAUGERI; RODRIGUES, 2004; LIN; WANG; SUNG, 2006; DAMASO et al., 2008).

Elibol e Ozer (2002) relataram a importância da transferência de oxigênio na produção de lipases por *Rhizopus arrhizus* via fermentação submersa, sendo que a implementação da transferência de oxigênio através de agitação e inserção de ar é um importante fator para a produção de lipases por microrganismos, em especial fungos filamentosos.

Cavalcanti et al. (2005) estudaram a influência da temperatura e do fluxo de ar na produção de lipases por fermentação em estado sólido em reatores de leito fixo e relataram a importância de elevados fluxos de ar nestes sistemas (fluxos de 0,8 L/min ocasionaram as maiores produtividades), principalmente com o objetivo de remoção do calor gerado, já que a transferência de ar não constitui-se como um fator crítico em processos envolvendo fermentação em estado sólido.

#### 2.1.3.4 Efeito dos indutores

A maioria das lipases é normalmente produzida em meios de cultura contendo fontes lipídicas, sugerindo que a produção da enzima ocorre por indução. Os indutores comumente mencionados em trabalhos de produção de lipases microbianas são azeites de oliva e palma, Tween 20 e 40, trioleína e tripalmitina, óleos de soja, girassol, algodão e milho (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Com o intuito de investigar o efeito do uso do farelo de trigo e do sabugo de milho como suporte para a produção de lipase por *Aspergillus niger*, Damaso et al. (2008) realizaram a adição do azeite de oliva em diferentes concentrações, tendo a função de fonte de carbono e indutor da síntese de lipases. O resultado mais expressivo foi obtido com farelo de trigo como suporte e 2 % de azeite de oliva (10,7 U/mL). Os autores ainda investigaram a possibilidade de substituição do azeite de oliva por resíduos da indústria do óleo de milho. O farelo de trigo foi mantido como suporte e os resíduos foram adicionados ao meio na concentração de 4 %, sendo eles a borra, a estearina e ácidos graxos. Verificou-se que os subprodutos do refino do óleo de milho podem ser utilizados como fonte de carbono e indutores do processo de síntese de lipases. As melhores atividades foram obtidas com a borra

e a estearina, de 13,8 U/mL e 8,3 U/mL, respectivamente. O uso do ácido graxo inibiu significativamente a síntese de lipases, provavelmente por ser o produto da hidrólise de fontes lipídicas, fenômeno que ocorre quando a síntese da enzima se dá pelo processo de indução/repressão.

O azeite de oliva foi utilizado para a produção de lipases por células livres e imobilizadas de *Aspergillus niger* no estudo realizado por Ellaiah et al. (2004). Foram testadas concentrações de 0 (zero) a 1,25 % de azeite de oliva, sendo as maiores atividades enzimáticas (4,23 U/mL) obtidas na concentração de 1 % da fonte de carbono, tanto pelas células livres como pelas imobilizadas. Já D'Annibale et al. (2006) estudaram a utilização de efluentes do processo de extração de azeite de oliva como substratos para a produção de lipases. Foram testados vários microrganismos, dentre os quais *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *Candida cylindracea*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium citinum*, *Rhizopus arrhizus* e *Rhizopus oryzae*. O microrganismo que apresentou os melhores resultados foi *C. cylindracea* NRRL Y-17506, o qual foi estudado como modelo. A produção de lipases foi afetada pela adição de fontes de carbono suplementares como o azeite de oliva e os óleos de soja e milho, na concentração de 3,0 g/L. A adição do azeite de oliva aumentou a atividade enzimática de 1,24 U/mL para 9,0 U/mL, enquanto a adição dos óleos de milho e soja resultou em atividades de 6,42 U/mL e 6,34 U/mL, respectivamente.

O óleo de gergelim foi utilizado na concentração de 0,5 % como indutor para a produção de lipases pelo microrganismo *Fusarium solani* em fermentação submersa, tendo apresentado o melhor resultado de atividade enzimática (0,88 U/mg ou 0,45 U/mg de proteína) dentre os óleos testados (trioleína, coco, milho, palma e oliva). O óleo de gergelim, embora tenha levado aos melhores resultados em atividade enzimática, apresentou as menores quantidades de proteína extracelular (o que indica maior atividade por unidade de proteína) e as menores concentrações de biomassa, o que seria uma vantagem comercial da produção. Embora substratos lipídicos e ácidos graxos possam atuar como indutores da produção de lipases, rendimentos elevados também podem ser conseguidos utilizando-se fermentação em estado sólido com o fungo filamentososo *Aspergillus* sem adição de óleos e gorduras (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Colla (2009) investigou a produção de lipases com atividade de hidrólise utilizando fungos filamentosos em cultivo submerso e por fermentação em estado sólido. No seu trabalho o indutor azeite de oliva proporcionou uma maior produção de lipases com atividade de hidrólise quando o cultivo foi realizado por fermentação em estado sólido, enquanto que o óleo de soja foi o indutor ideal para o cultivo submerso. Embora o azeite de oliva tenha

apresentado resultados maiores para a produção de lipases por *Aspergillus* spp. em fermentação em estado sólido (29,6 U/g a 57,3 U/g), os resultados obtidos com óleo de soja também foram promissores (28,6 U/g a 48,4 U/g).

Rizzardí (2012) selecionou fungos produtores de lipases com atividade de esterificação via fermentação em estado sólido, sendo que obteve resultados maiores de atividade enzimática utilizando o óleo de soja como indutor na concentração de 1 %.

#### 2.1.3.5 Efeito do inóculo

O inóculo apresenta-se como um fator determinante na produção de lipases por fungos filamentosos. Não apenas a quantidade, mas também o tipo (esporos ou hifas vegetativas) e a idade do inóculo podem mostrar resultados distintos (PAPAGIANNI; MOO-YOUNG, 2002).

Normalmente o inóculo empregado é na forma de esporos, sendo que concentrações abaixo de  $10^6$  esporos/g<sub>meio</sub> levam a maiores tempos para produção da enzima, enquanto que concentrações acima de  $10^8$  esporos/g<sub>meio</sub> não promovem aumento da produtividade. Apesar da diferença nos resultados de produtividade a cinética de produção de lipase mostra ser semelhante, mesmo em concentrações entre  $10^6$  e  $10^8$  esporos/g<sub>meio</sub> (GULATI; SAXENA; GUPTA, 2000).

#### 2.1.4 Purificação das lipases

Os processos a jusante da fermentação visam recuperar as enzimas produzidas no meio fermentado. As etapas de separação e purificação removem as substâncias tóxicas e/ou metabólitos indesejáveis.

Embora a maior parte das aplicações industriais não necessite de uma preparação homogênea, boa parte das aplicações comerciais das lipases requer um grau de pureza que permita a sua utilização. As principais restrições nas estratégias de purificação incluem baixo rendimento, uso de reagentes químicos e longo período de tempo (NAGARAJAN, 2012; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Os processos de purificação devem apresentar baixo custo, alto rendimento, velocidade e serem viáveis em processos em escalas maiores, a fim de viabilizar o uso industrial (SAXENA et al., 2003).

#### 2.1.4.1 Técnicas de separação e extração das lipases

Os passos de pré-purificação envolvem a concentração do caldo contendo as enzimas sem os microrganismos que as produziram. As células microbianas podem ser separadas do caldo por centrifugação ou filtração. No caso dos fungos, essa separação pode ser realizada por filtração simples, já as bactérias e leveduras possuem como desvantagem a necessidade de metodologias de filtração de custo mais elevado e podem necessitar de uma floculação com agentes convencionais químicos (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

A precipitação pode ser utilizada como uma etapa primária de separação, possibilitando elevado rendimento. O uso de precipitação com sulfato de amônio apresenta diversas vantagens, como: baixo custo, alta solubilidade, proteção natural das enzimas e rendimento de até 90 %. Entretanto, o uso de soluções saturadas de sulfato de amônio torna o processo mais lento, além de gerar quantidades elevadas de resíduos químicos.

Para a fermentação em estado sólido uma etapa que vem sendo pesquisada nos últimos anos é a extração da enzima. Sabe-se que a temperatura e o pH são parâmetros importantes para a extração dos solutos, assim como o tipo de solvente, a razão sólido-líquido, agitação e tempo de contato, além da relação entre as variáveis.

Vardanega et al. (2010) avaliaram a extração de lipase de *Penicillium* sp. produzida por fermentação em estado sólido, variando a temperatura, o pH, a agitação e a razão sólido-líquido. No trabalho foi verificado que pode ser obtida uma maior extração utilizando tampão fosfato 0,1 mol/L em pH 8,5 a 25 °C, 150 rpm de agitação e com uma razão de extração de 1:20 durante 15 minutos de extração.

Menoncin et al. (2010) investigaram a extração e concentração das lipases produzidas por *Penicillium verrucosum* em fermentação em estado sólido. Os pesquisadores concluíram que as melhores condições de extração eram a 37 °C com pH 7,0. No trabalho também foi efetuada a precipitação com solução de sulfato de amônio, sendo que as condições que apresentaram maior atividade enzimática foram aquelas que utilizaram 60 % de saturação durante 5 horas de extração.

Em estudo realizado por Silva et al. (2011), envolvendo a extração e concentração da lipase produzida por *Penicillium brevicompactum* em fermentação em estado sólido, obteve-se aumento da atividade hidrolítica de 31,82 U/g para 227,57 U/g e aumento da atividade de esterificação de 170,92 U/g para 207,40 U/g após precipitação com sulfato de amônio.

#### 2.1.4.2 Técnicas de purificação das lipases

Após a separação o caldo fermentado contendo a enzima de interesse é concentrado por evaporação a vácuo ou por processos de ultrafiltração. Essa etapa tem como objetivo obter uma maior atividade específica (unidade enzimática por massa de proteína) com a melhor recuperação possível da atividade inicial (ORLANDELLI et al., 2012).

Diferentes estratégias para a purificação das lipases têm sido utilizadas, em função da fonte microbiana. Algumas bactérias, como as do gênero *Pseudomonas* podem produzir lipases intracelulares além das mais comuns, que são extracelulares, quando o meio de cultura possui nutrientes diferenciados, exigindo a ruptura da célula e posterior extração da enzima. Enquanto alguns autores investigaram a purificação de lipases bacterianas realizando a precipitação com sulfato de amônio, outros utilizaram processos de precipitação com acetona, filtração em gel, cromatografia, troca iônica e/ou ultrafiltração. Os estudos relacionando as lipases produzidas por leveduras mostram que já foram utilizadas técnicas como precipitação com etanol ou com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica. As enzimas produzidas por fungos filamentosos, os quais apresentam uma extensa diversidade de lipases sintetizadas, já passaram por alguns estudos para aprimorar a sua purificação. Técnicas como as estudadas para lipases produzidas por bactérias e leveduras foram avaliadas, mostrando que diferentes estratégias de purificação devem ser necessárias em virtude do grau de pureza requerido, do tipo de matéria-prima utilizado e da disponibilidade de equipamentos (SAXENA et al., 2003).

Três diferentes enzimas (caracterizadas como lipases com massa molar de 43 kDa e 65 kDa e como esterase simples com massa molar de 31 kDa), produzidas por *Aspergillus niger* e contidas em extrato proteico comercial foram separadas por Fernández-Lorente et al. (2005) utilizando suportes hidrofóbicos de adsorção e dessorção. Os autores mostraram a viabilidade de separar as lipases utilizando técnicas de adsorção e dessorção com gel de octil-agarose, Triton X-100 e suporte de octadecil-Sepabeads.

Iftikhar et al. (2011) produziram lipases com cepas de *Rhizopus oligosporus*, precipitando as enzimas com sulfato de amônio, efetuando centrifugação, ressuspensão e posterior purificação com cromatografia de troca iônica e cromatografia em gel. Os resultados com a cepa nativa do microrganismo mostraram aumento de até 1,7 vezes na atividade específica após a precipitação com sulfato de amônio e de até 446 vezes após a purificação por cromatografia, mas a atividade enzimática diminuiu de 25 U/mL para 14 U/mL, em virtude do volume necessário para ressuspensão da enzima após a cromatografia. Além disso,

o percentual de recuperação foi de cerca de 55 % após a cromatografia em gel, indicando que houve perda de enzimas no processo.

#### *2.1.4.3 Outras estratégias de purificação das lipases*

Em virtude das lipases microbianas serem enzimas extracelulares os passos iniciais de purificação envolvem a concentração do meio fermentado contendo a enzima por precipitação com sulfato de amônio, extração com solventes orgânicos ou por ultrafiltração. Os métodos sequenciais de purificação podem envolver técnicas como cromatografia de interação, filtração em gel ou extração em sistemas bifásicos. A combinação de pH neutro, elevada umidade e condições não drásticas de temperatura tornam a extração em sistema aquoso bifásico um método interessante para a purificação de biomoléculas. Sistemas aquosos bifásicos são normalmente formados por sistemas contendo polímeros e sais. Os polímeros solúveis em água mais empregados são o polietilenoglicol e a dextrana, enquanto que a solução salina normalmente é o fosfato de potássio ou o sulfato de magnésio. Esta técnica, por si só, não é suficiente para purificar proteínas com elevado grau de pureza, sendo normalmente seguida por cromatografia (NAGARAJAN, 2012).

Algumas alternativas estão se tornando mais comuns para a purificação das lipases, como sistemas bifásicos, imobilização em suportes e processos de separação por membranas (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). Outra técnica que pode ser utilizada é a purificação utilizando líquidos iônicos. Nesta técnica utilizam-se sistemas aquosos bifásicos com vários líquidos catiônicos e aniônicos em combinação com sais inorgânicos (VENTURA et al., 2011).

## **2.2 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS**

### **2.2.1 Aspectos gerais**

Os processos de separação por membranas são relativamente recentes. Somente nos últimos cinquenta anos houve um avanço mais significativo relacionado ao preparo das membranas com fins industriais. As membranas realizam a separação de dois ou mais componentes de um fluido em função da diferença de tamanho, de concentração e afinidade química (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

As tecnologias de separação por membranas podem trazer uma economia considerável em operações de separação. As vantagens da tecnologia de separação com membranas incluem condições de processamento menos severas, baixo consumo de energia e baixo volume de resíduos químicos produzidos, simplicidade de operação e de aumento de escala, além de possibilitar a separação de compostos em temperatura ambiente, permitindo assim que soluções sensíveis à temperatura sejam tratadas sem que seus constituintes sofram dano ou alteração química (STRATHMANN; GIORNO; DRIOLI, 2006).

Em muitos casos, processos de separação por membranas são comparados favoravelmente com outras técnicas de separação. Deste modo, as membranas são usadas em larga escala para produzir água potável a partir da água do mar, purificar efluentes industriais e recuperar constituintes que possuam valor comercial, bem como para concentrar, purificar ou fracionar soluções macromoleculares em indústrias químicas e de alimentos. Membranas podem ser feitas sob medida, assim suas propriedades de separação podem ser ajustadas para uma tarefa específica de separação (MULDER, 1996; STRATHMANN, 2001).

Há diversos processos com membranas, os quais são baseados em distintos princípios de separação. A força motriz que rege o movimento depende das características da membrana, sendo aplicados gradientes de pressão, de concentração, de temperatura ou de potencial elétrico para promover o movimento das partículas envolvidas através da membrana (MULDER, 1996).

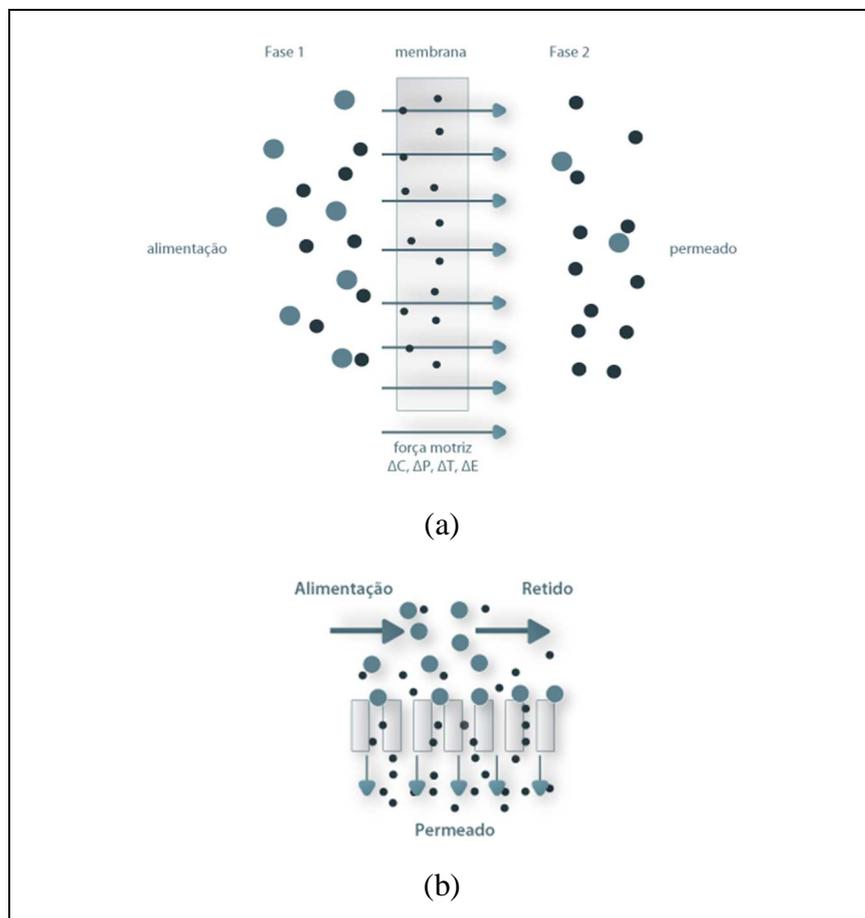
### **2.2.2 Características da filtração tangencial**

Independentemente do tipo de membrana, propriedades de transporte como permeabilidade a gases e líquidos, bem como sua capacidade seletiva são utilizados como parâmetros característicos do processo. Para que ocorra o transporte de uma espécie através da membrana é necessária a existência de uma força motriz agindo sobre a mesma. Os processos comerciais de separação com membranas utilizam como força motriz o gradiente de potencial químico e/ou o gradiente de potencial elétrico. Como os processos com membranas são, em sua grande maioria, atérmicos, o gradiente de potencial químico pode ser expresso, apenas, em termos do gradiente de pressão e de concentração (pressão parcial). Em função da morfologia da membrana e da força motriz aplicada, o transporte de diferentes espécies através da membrana pode ocorrer tanto pelo mecanismo de convecção como pelo de difusão (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

Uma das características dos processos de separação com membranas é que eles podem ser operados em fluxo cruzado (filtração tangencial, *cross flow filtration*), além da operação clássica do tipo perpendicular ou frontal (*dead end filtration*), conforme apresentado na Figura 2.2.

Na filtração convencional, esquematizada na Figura 2.2 (a) o fluido é pressionado contra a membrana filtrante e escoo perpendicularmente através dela, fazendo com que os solutos se depositem sobre a sua superfície (ocorrendo à formação de torta de filtração), o que torna necessária a interrupção do processo para limpeza e substituição da membrana.

Figura 2.2 – Representação esquemática dos sistemas de filtração: (a) filtração frontal ou perpendicular (*dead end filtration*), (b) filtração tangencial (*cross-flow filtration*)



Fonte: Universidade de Coimbra (2014).

Na filtração tangencial, mostrada na Figura 2.2(b), a solução de alimentação flui paralelamente à membrana, e o fluxo de permeado, perpendicularmente, o que permite o escoamento de grandes volumes de fluidos, pois este tipo de escoamento, a altas velocidades, tem o efeito de arrastar os sólidos que tendem a se acumular sobre a superfície da membrana.

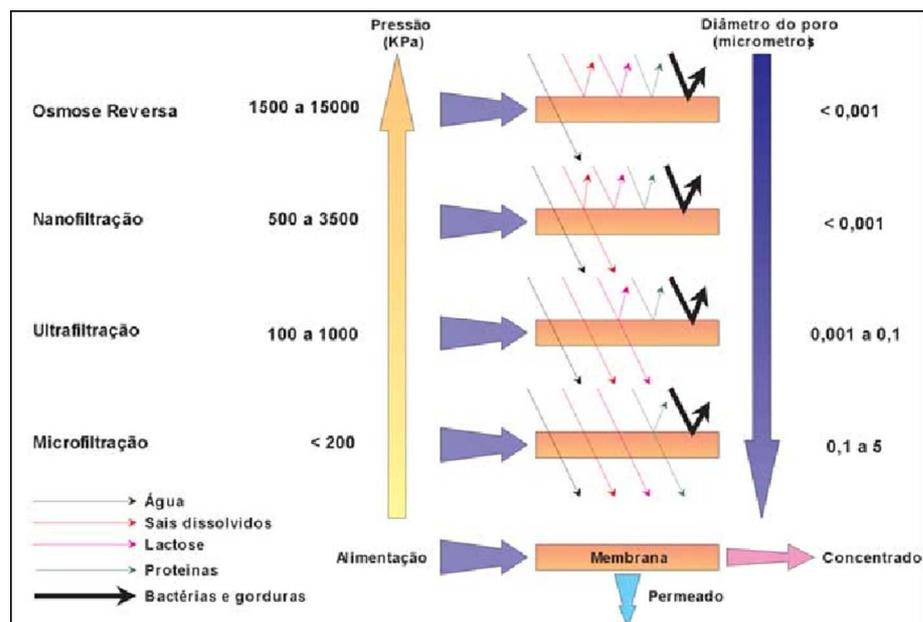
Como ocorre menor acúmulo de material retido sobre a superfície da membrana, esta tem menos tendência ao entupimento, e a produção pode ser mantida por períodos maiores de tempo (MULDER, 1996; STRATHMANN; GIORNO; DRIOLI, 2006).

Na filtração tangencial, a alimentação é realizada paralela à superfície da membrana, e somente partes dos solutos se acumulam devido aos fenômenos de incrustação e polarização por concentração, sendo a outra parcela conduzida para fora do módulo pela corrente de concentrado ou rejeito, evitando a formação da torta de filtração (MULDER; 1996; STRATHMANN; GIORNO; DRIOLI, 2006).

### 2.2.3 Aplicações dos processos de separação por membranas

Processos com membranas para os quais a diferença de pressão é a força motriz têm sido utilizados para concentrar, fracionar e purificar soluções diluídas, em particular soluções aquosas. Em função da natureza e do tipo de solutos e da presença ou não de partículas em suspensão, são empregadas membranas com diferentes tamanhos e distribuição de poros, ou mesmo densas, caracterizando os processos conhecidos como microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e osmose inversa (OI), conforme representado na Figura 2.3 e descrito no Quadro 2.1.

Figura 2.3 – Representação dos processos de filtração por membranas que utilizam o gradiente de pressão como força motriz



Fonte: Mierzwa et al. (2008).

Quadro 2.1 – Características dos principais processos de separação por membranas que utilizam o gradiente de pressão como força motriz

<b>Processo</b>	<b>Pressão</b>	<b>Diâmetro de poro</b>	<b>Retido</b>	<b>Permeado</b>	<b>Aplicação</b>
<b>Microfiltração</b>	10 – 200 (kPa)	0,05 – 10 (µm)	Partículas em suspensão e microrganismos com massa molar maior que 500 kDa	Água e sólidos dissolvidos	Esterilização, clarificação, concentração de células
<b>Ultrafiltração</b>	100 – 500 (kPa)	5 – 100 (nm)	Macromoléculas com massa molar maior que 5 kDa	Água, sais e moléculas pequenas	Fracionamento e concentração de proteínas, recuperação de pigmentos e óleos
<b>Nanofiltração</b>	0,5 – 3 (MPa)	1 – 10 (nm)	Moléculas com massa molar maior que 0,5 kDa	Água, sais e moléculas pequenas	Purificação de enzimas
<b>Osiose inversa</b>	3 – 10 (MPa)	< 1 (nm)	Material solúvel ou em suspensão	Água	Dessalinização de água

Fonte: adaptado de Habert; Borges; Nobrega (2006) e Strathmann; Giorno; Drioli (2006).

#### 2.2.4 Tipos de membranas

Em função das aplicações a que se destinam, as membranas apresentam diferentes morfologias. As características da superfície da membrana que estão em contato com a solução a ser separada é que vão definir que tipo de morfologia utilizar. Dois tipos de parâmetros são normalmente empregados para se caracterizar membranas: parâmetros de natureza morfológica e parâmetros relativos a suas propriedades de transporte. As membranas podem ser classificadas da seguinte forma (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006):

- a) Primeira geração: membranas de acetato de celulose, apresentando limitações quanto a extremos de pH, altas temperaturas, tipos de agentes sanitizantes;
- b) Segunda geração: membranas orgânicas de polímeros sintéticos, apresentando maior resistência a agentes químicos e temperatura;
- c) Terceira geração: membranas inorgânicas de materiais cerâmicos, à base de zircônio ou alumina depositados sobre um suporte de grafite, apresentando elevada resistência mecânica, térmica e química.

Do ponto de vista morfológico as membranas podem ser classificadas em densas (homogêneas) ou porosas (heterogêneas). As membranas porosas apresentam como principal

mecanismo de transporte a diferença de tamanho entre as partículas, enquanto que o mecanismo das membranas densas se baseia na sorção dos componentes no material da membrana, difusão destes através da mesma e posterior dessorção do lado do permeado (MULDER, 1996; STRATHMANN; GIORNO; DRIOLI, 2006).

Em relação à estrutura as membranas podem ser classificadas como simétricas (isotrópicas) ou assimétricas (anisotrópicas), sendo que as membranas simétricas apresentam o tamanho de poro uniforme em sua seção transversal (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

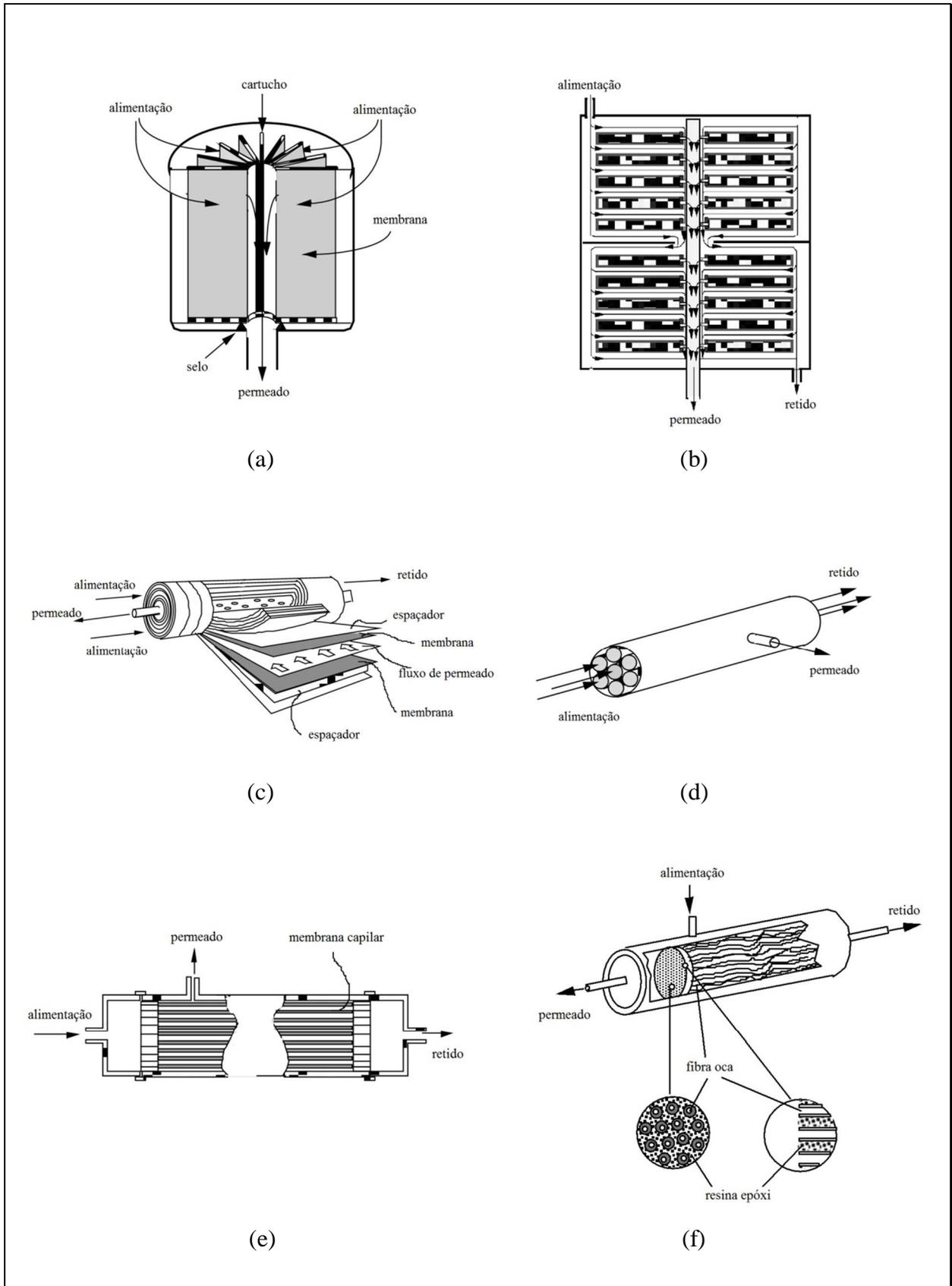
As membranas poliméricas podem ser sintetizadas por diferentes técnicas como sinterização, estiramento, bombardeamento com partículas, recobrimento e inversão de fases (STRATHMANN, 2001). As membranas poliméricas podem ser fabricadas com diversos polímeros, desde que estes ofereçam barreiras seletivas à permeação. Os polímeros mais utilizados para a produção de membranas são: polissulfona, polietersulfona, fluoreto de polivinilideno, policarbonato, politetrafluoretileno, polipropileno, poliacrilonitrila, acetato de celulose, entre outros (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

### **2.2.5 Tipos de módulos de separação**

Industrialmente os módulos de membranas são usados em seis configurações principais (cartucho pregueado, placa e quadro, espiral enrolada, tubular, capilar, fibra oca), os quais se mostram diferentes em diversos aspectos: desenho, modo de operação, custos de produção e requerimentos de energia para o sistema de alimentação, conforme diagramas esquemáticos apresentados na Figura 2.4 (STRATHMANN; GIORNO; DRIOLI, 2006).

O módulo de cartucho pregueado é usualmente utilizado em filtração frontal, do tipo *dead end*, em sistemas pressurizados. A alimentação entra por fora e o permeado é recolhido por um duto central. O tipo placa e quadro deriva dos filtros-prensa convencionais, e consiste em placas delgadas recobertas em ambas as faces pelas membranas. Nestas placas existem pequenas ranhuras em que flui o permeado depois de passar através da membrana, sendo que o permeado chega a um tubo central por onde é coletado. A configuração de módulo de membrana em espiral enrolada é constituída por um envoltório de membrana em torno de uma matriz a qual é ligada a um tubo perfurado. A solução a ser filtrada escoia na direção axial através da superfície da membrana, sendo que o permeado é recolhido por intermédio de um tubo interno perfurado no centro do módulo.

Figura 2.4 – Diagrama esquemático dos principais tipos de módulos de filtração por membranas: (a) cartucho, (b) placa e quadro, (c) espiral enrolada, (d) tubular, (e) capilar, (f) fibra oca



Fonte: adaptado de Strathmann; Giorno; Drioli (2006).

Os dispositivos tubulares consistem em feixes paralelos de tubos porosos ou perfurados, de paredes rígidas. A alimentação pressurizada escoar no interior dos tubos e o permeado goteja pela superfície externa e é reunido por dutos apropriados. O diâmetro dos tubos internos normalmente varia entre 1 cm e 2,5 cm. Os módulos de capilares consistem em diversos tubos com diâmetro interno de 0,2 mm a 3 mm arranjados em paralelo como um feixe de tubos. A alimentação passa por dentro dos tubos, e o permeado é recolhido na carcaça do tubo. Nos módulos de fibra oca, o líquido de entrada escoar sobre a superfície externa das fibras sob pressão e o permeado é coletado pela parte interna das fibras. O diâmetro externo das fibras normalmente varia entre 50  $\mu\text{m}$  e 100  $\mu\text{m}$ .

### **2.2.6 Parâmetros de processo para microfiltração e ultrafiltração**

Algumas características importantes para a filtração são: porosidade, espessura, seletividade e permeabilidade. A porosidade não deve ser entendida somente como sendo o tamanho de poros e sim como uma relação entre a parte sólida e os poros da membrana. A porosidade pode ser relativa à parte superficial ou a toda membrana. Quanto maior a porosidade da subcamada, menor será a resistência ao fluxo de solventes através da membrana. Um aumento na porosidade superficial não implica necessariamente em redução nos níveis de retenção de macromoléculas, já que este aumento pode ser devido ao maior número de poros e não a um aumento em seus diâmetros médios (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

A eficiência de separação não é apenas determinada pelas propriedades da membrana, também depende do tipo de módulo utilizado e da força aplicada durante sua condução. Nos processos de separação por membranas os componentes estão geralmente concentrados no chamado produto retido e em menores concentrações no permeado. Os principais parâmetros operacionais que afetam o fluxo permeado são: pressão, temperatura, viscosidade, densidade e velocidade tangencial. Os processos de microfiltração e ultrafiltração utilizando membranas porosas ocorre principalmente pela retenção por tamanho. A seletividade a determinado soluto se dá essencialmente na pele da membrana, sendo que importantes parâmetros para esses processos são o fluxo permeado, a retenção e a permeabilidade hidráulica (MULDER, 1996).

### 2.2.6.1 Fluxo permeado

O fluxo permite quantificar o material que atravessa a membrana. O fluxo permeado, determinado pela Equação 2.1, normalmente é expresso em L/(m<sup>2</sup>.h) ou kg/(m<sup>2</sup>.h), permitindo comparar a permeabilidade de membranas com áreas distintas.

$$J = \frac{V_p}{A_m \times t_m} \quad (2.1)$$

Sendo:

$J$ : fluxo permeado (L/m<sup>2</sup>.h)

$V_p$ : volume de permeado (L)

$A_m$ : área da membrana (m<sup>2</sup>)

$t_m$ : tempo de filtração (h)

### 2.2.6.2 Permeabilidade hidráulica

A permeabilidade hidráulica é constante para uma dada membrana e é função de diversos parâmetros: difusividade do solvente na matriz polimérica, concentração do solvente, volume específico do solvente, constante universal dos gases, temperatura do sistema e espessura da membrana.

Nas membranas porosas de microfiltração e de ultrafiltração o fluxo volumétrico do solvente é predominantemente viscoso (convectivo), e pode ser descrito pela Equação 2.2, quando a pressão osmótica da solução é desconsiderada. Salienta-se que o fluxo permeado diminui com o aumento da viscosidade, ou seja, a permeabilidade da membrana é inversamente proporcional à viscosidade do meio fluido (MEHTA; ZYDNEY, 2005).

$$J = L_p \times \Delta P \quad (2.2)$$

Sendo:

$J$ : fluxo permeado (L/m<sup>2</sup>.h)

$L_p$ : permeabilidade hidráulica (L/m<sup>2</sup>.Pa.h)

$\Delta P$ : pressão transmembrana (Pa)

### 2.2.6.3 Retenção

A retenção, ou rejeição de solutos, determinada pela Equação 2.3, pode ser definida como a capacidade de separação de uma membrana.

$$R = \left(1 - \frac{C_{\text{permeado}}}{C_{\text{retido}}}\right) \times 100 \quad (2.3)$$

Sendo:

$R$ : retenção (%)

$C_{\text{permeado}}$ : concentração do componente no permeado

$C_{\text{retido}}$ : concentração do componente no retido

Muitas vezes a retenção é apresentada em termos percentuais, sendo que o conceito utilizado pelos fabricantes de membrana para definir o peso molecular de um soluto no qual a membrana apresenta 90 % de retenção é chamada de “corte da membrana” (*cut off*). No entanto, não existe uma padronização neste valor de 90 %, quando comparados diferentes fabricantes, além das condições de operações serem muitas vezes distintas (MEHTA; ZYDNEY, 2005).

### 2.2.7 Fatores limitantes da microfiltração e da ultrafiltração

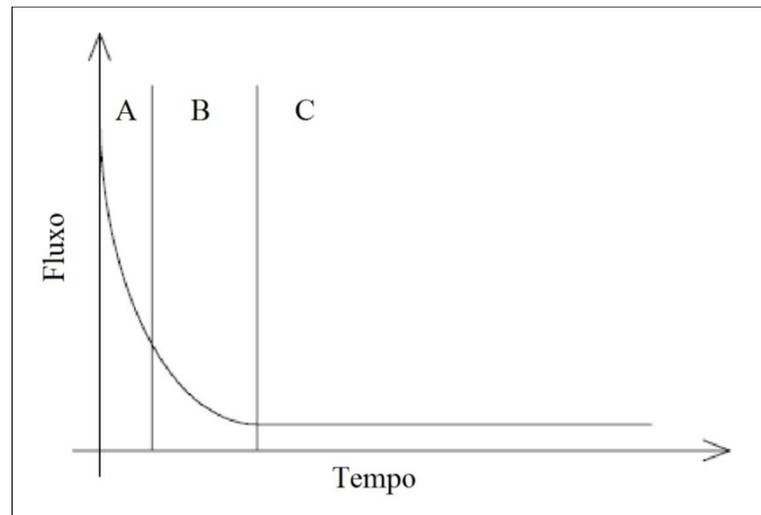
Quando um processo de separação por membranas de microfiltração ou de ultrafiltração em modo tangencial entra em operação, pode-se observar uma queda do fluxo de permeado em função do tempo, conforme apresentado na Figura 2.5.

A redução do fluxo é o resultado do aumento na resistência da membrana pelo bloqueio dos poros e a formação de uma camada de torta sobre sua superfície. O bloqueio de poros aumenta a resistência da membrana, enquanto que a formação de torta cria uma camada adicional de resistência ao fluxo permeado. Esse processo reduz a taxa de produção de permeado e aumenta a complexidade da operação de filtração por membranas (SONG, 1998; ABDELRASOUL; DOAN; LOHI, 2013).

Pode-se dizer que a diminuição do fluxo é um processo causado principalmente por dois fenômenos que limitam o transporte: polarização por concentração e incrustação

(*fouling*), sendo que o primeiro ocorre rapidamente enquanto que o segundo ocasiona uma queda gradual e em longo prazo no fluxo.

Figura 2.5 – Representação esquemática da diminuição do fluxo permeado durante o processo de ultrafiltração, com identificação das zonas: (A) queda rápida inicial do fluxo, (B) queda lenta e gradual de fluxo, (C) estado estacionário



Fonte: adaptado de Nigam; Bansal; Chen (2008).

### 2.2.7.1 Polarização por concentração

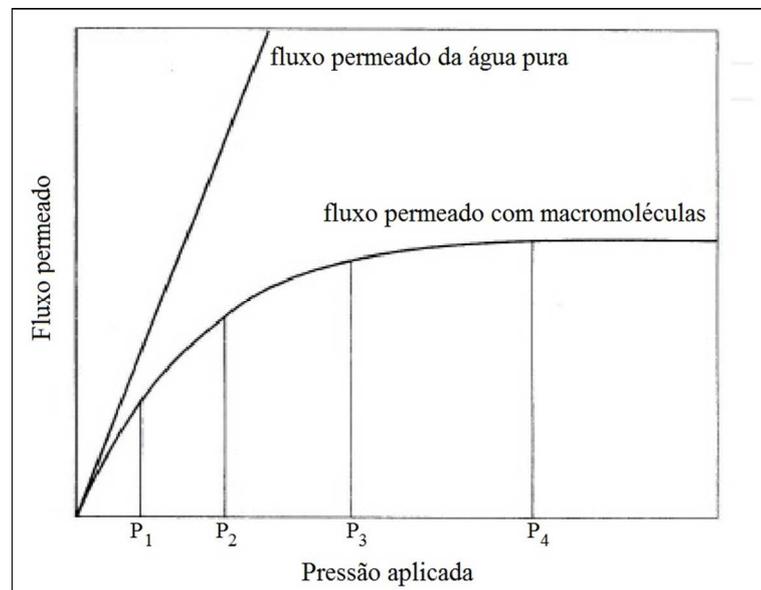
A polarização por concentração é um termo utilizado para descrever o acúmulo de solutos próximo à superfície da membrana, o que resulta em uma concentração do soluto nessa região muito maior do que na corrente de alimentação. Isto pode ser representado como uma redução na força ocasionada pela pressão transmembrana devido a uma diferença de pressão osmótica entre o permeado e a solução de alimentação imediatamente adjacente à superfície da membrana (FIELD, 2010).

Uma vez que a membrana é seletiva, isto é, permite a passagem apenas de alguns solutos, haverá um acúmulo dos solutos que são largamente rejeitados pela membrana, ocorrendo um aumento da sua concentração nesta região próxima a membrana. Como consequência, formar-se-á uma camada concentrada na interface da mesma que oferecerá uma resistência adicional à transferência de massa. Este fenômeno resulta na formação de um gradiente de concentração no lado de maior pressão da membrana, o que ocasiona uma corrente difusiva do soluto em direção oposta ao fluxo do solvente pela membrana (STRATHMANN; GIORNO; DRIOLI, 2006).

A polarização por concentração é uma consequência natural da seletividade de uma membrana e é um fenômeno inevitável, mas é reversível com a eliminação da pressão transmembrana e, conseqüentemente, do fluxo (FIELD, 2010).

O controle da pressão transmembrana afeta a velocidade de permeação. À medida que a pressão aumenta, a força do fluido que flui para a membrana é aumentada, conduzindo a um fluxo de permeado elevado. O aumento da influência de pressão aplicada ao fluxo de permeado, apresentado na Figura 2.6, mostra que, à medida que a pressão aplicada em um processo de filtração com solutos é aumentada, eleva-se o efeito do fenômeno de polarização por concentração, pela maior quantidade de material retido na superfície da membrana. Se a pressão for aumentada mais ainda (ultrapassando o ponto identificado na Figura 2.6 como  $P_3$ ), a polarização por concentração se torna suficiente para que os solutos retidos na superfície da membrana formem uma camada de gel, impedindo que o aumento adicional da pressão aplicada conduza a um aumento do fluxo permeado. Isto limita o fluxo permeado através da membrana e, por conseguinte, o fluxo atinge um nível de estado estacionário (ABDELRASOUL; DOAN; LOHI, 2013).

Figura 2.6 – Efeito da pressão no fluxo permeado em um processo de filtração tangencial



Fonte: Abdelrasoul; Doan; Lohi (2013).

O fenômeno designado de polarização por concentração assume maior importância no caso da ultrafiltração de hidrocoloides, macromoléculas e outros solutos de elevado peso molecular. Outras condições do processo, tais como as interações entre os solutos e a membrana, o pH do meio, o tamanho e a morfologia da própria membrana, concorrem para o

aparecimento de resistências adicionais devido à formação da camada gel, do entupimento dos poros e da adsorção de solutos na superfície da membrana.

A formação da zona de polarização pode ser minimizada através do aumento da velocidade de escoamento tangencial devido ao aumento da turbulência. O efeito de mistura, nas proximidades da superfície da membrana, arrasta uma parte significativa dos solutos acumulados, na maioria das vezes por adsorção, reduzindo a espessura da camada gel e aumentando a velocidade de permeação (ABDELRASOUL; DOAN; LOHI, 2013).

#### 2.2.7.2 *Incrustação (fouling)*

Nos processos de microfiltração e de ultrafiltração, além da importância da polarização por concentração na redução do fluxo de permeado ocorre também um fenômeno chamado incrustação ou colmatação (*fouling*). Este fenômeno provoca a redução do desempenho da membrana devido ao depósito de substâncias suspensas e/ou dissolvidas, orgânicas e/ou inorgânicas na sua superfície e/ou em seu interior.

De acordo com Field (2010) a incrustação pode assumir as seguintes formas:

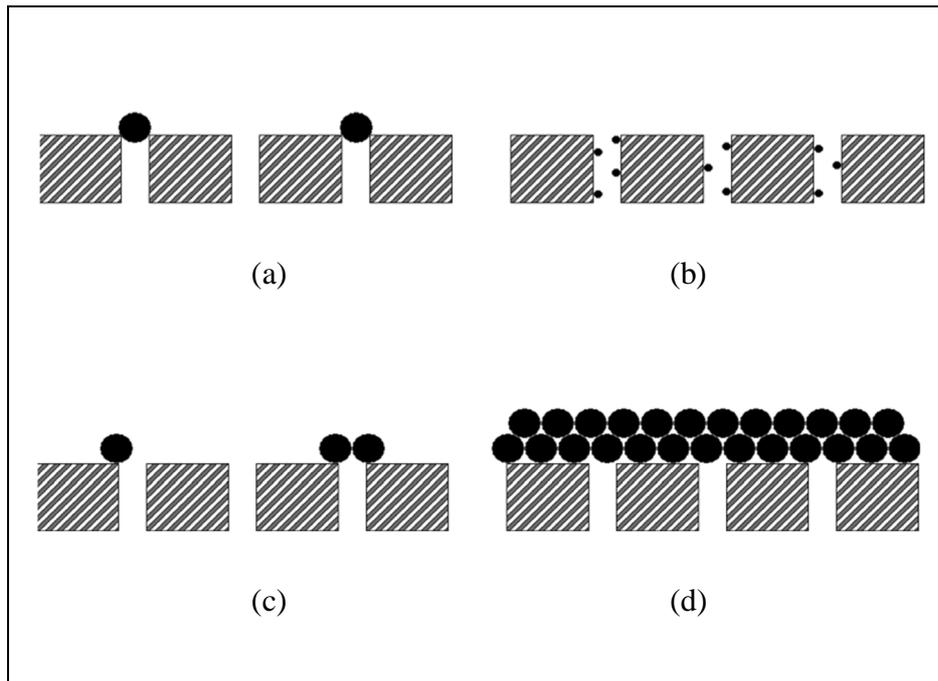
- a) Adsorção: ocorre quando existem interações específicas entre a membrana e as partículas. Uma monocamada de partículas pode se formar até na ausência de permeação, conduzindo a uma resistência hidráulica adicional.
- b) Bloqueio dos poros: durante o processo de filtração pode ocorrer um bloqueio físico dos poros, levando a uma redução no fluxo devido ao entupimento total ou parcial dos poros.
- c) Deposição: um depósito de partículas pode crescer, camada a camada, na superfície da membrana, conduzindo a uma importante resistência hidráulica adicional. Esta é muitas vezes referida como resistência da torta.
- d) Formação de gel: para certas macromoléculas, o nível de polarização por concentração pode levar à formação de gel nas imediações da superfície da membrana.

Na prática o depósito formado representa uma segunda membrana sobre a primeira, o que reduz a sua permeabilidade e modifica as suas propriedades de retenção de partículas. A extensão da incrustação depende da natureza da solução, mas depende, também, das condições de operação do sistema em questão (ABDELRASOUL; DOAN; LOHI, 2013).

Para membranas porosas a área ativa da membrana é a área dos poros. Assim, a maioria dos mecanismos de incrustação está relacionada a eles e aos processos que conduzem

a uma redução do número de poros ativos. Com base nisso, geralmente quatro mecanismos de incrustação em membranas porosas podem ser observados, conforme mostrado na Figura 2.7: bloqueio completo de poros, bloqueio interno de poros, bloqueio parcial de poros e formação de torta (FIELD, 2010).

Figura 2.7 – Mecanismos de incrustação das membranas porosas: (a) bloqueio completo de poros, (b) bloqueio interno de poros, (c) bloqueio parcial de poros, (d) formação de torta



Fonte: Field (2010).

As incrustações ocasionam aumento nos custos de operação, maior gasto de energia, aumento nas quantidades de lavagens da membrana e redução da vida útil dos elementos da membrana. A diminuição do efeito de incrustação e até sua reparação pode ser feita por meio de pré-tratamento da alimentação para limitar a sua propensão à incrustação, por melhoria das propriedades físico-químicas da membrana, pela limpeza da membrana e pela otimização das condições de operação (ABDELRASOUL; DOAN; LOHI, 2013).

A incrustação pode ser controlada através de procedimentos como a aplicação de gradientes de pressão mais reduzidos ou atuando em nível da composição química das membranas de forma a alterar as interações soluto-superfície da membrana. Um critério muito importante para a realização de um processo de separação por membranas é o controle da polarização por concentração e da incrustação. Em alguns módulos, tais como o tubular, o de placas planas e capilar pode-se controlar a polarização por concentração e o entupimento da membrana eficazmente pelo fluxo de alimentação adequada. Outros módulos, tais como o

espiral enrolado e o de fibra oca são mais sensíveis para a incrustação (STRATHMANN; GIORNO; DRIOLI, 2006).

Apesar dos processos de ultrafiltração apresentarem diversas vantagens, faz-se necessária uma maior avaliação dos parâmetros de processo que influenciam na formação de incrustação na membrana. Em estudo realizado para este fim foi avaliada a eficiência da filtração de uma membrana cerâmica tubular de ultrafiltração para separar corantes orgânicos. Os autores obtiveram remoção de matéria orgânica superior a 98 %, entretanto verificaram que as características da torta formada no processo inicial de filtração foram mais importantes para a filtração que os seguintes parâmetros: tamanho do poro, pressão transmembrana e concentração da alimentação (ZURIAGA-AGUSTÍ et al., 2014).

Em processos de ultrafiltração realizados por períodos maiores (pelo menos dois dias) o efeito das propriedades da membrana sobre a incrustação e, conseqüentemente, sobre o fluxo permeado não é significativo, sendo mais importante o efeito de interação entre as partículas e a camada depositada. Isto porque a torta inicialmente formada na superfície da membrana impede que ocorram interações significativas diretas desta com as partículas que estão sendo filtradas (WANG; TANG, 2011).

Mais recentemente os campos elétricos e ultrassônicos estão sendo aplicados simultaneamente para aumentar a seletividade das membranas e diminuir o efeito de incrustação nas mesmas (VARDANEGA et al., 2013). Embora o tamanho das partículas seja um dos principais fatores que predizem a separação com membranas, outras variáveis, como as interações eletrostáticas entre proteínas, pH, temperatura e polarização por concentração também apresentam efeito para a eficiência do processo. Assim, técnicas de modelagem do processo de ultrafiltração para fracionamento e concentração de proteínas, estão sendo estudadas a fim de otimizar o processo. Em virtude das redes neurais tenderem a incluir muitos parâmetros que requerem dados experimentais, podem ser utilizados métodos empíricos com modelos polinomiais para a otimização dos parâmetros de processo da ultrafiltração (BHADOURIA et al., 2014).

A modelagem dos processos de filtração tangencial que envolvem incrustação tem sido proposta por diversos autores, utilizando os modelos tradicionais isolados ou combinados, em virtude do tipo de interação que ocorre entre a membrana e as partículas que estão sendo filtradas (BOLTON; LACASSE; KURIYEL, 2006; MONDAL; DE, 2010; BRIÃO; TAVARES, 2012).

### 2.2.8 Ultrafiltração para separação e concentração de proteínas e enzimas

A separação, concentração e purificação primária de proteínas pode ser efetuada por diferentes técnicas de separação por membranas. As principais metodologias para este fim são: microfiltração (convencional e com campo elétrico), ultrafiltração (convencional, com membranas carregadas, com campo elétrico, com campo ultrassônico), nanofiltração, cromatografia com membranas, membranas de eletroforese (SAXENA et al., 2009).

A ultrafiltração apresenta-se como uma técnica de processo atrativa, em função da elevada estabilidade térmica e alta resistência física e química dos polímeros que compõem a membrana (SAXENA et al., 2009). Entretanto, a eficiência do processo normalmente é limitada pela incrustação da proteína na membrana, resultando em declínio do fluxo permeado e perda da atividade catalítica. A fim de melhorar o processo Krstic et al. (2007) inseriram um agitador no interior de uma membrana de cerâmica, aumentando a turbulência e, conseqüentemente, diminuindo a incrustação, especialmente para as suspensões com maior viscosidade.

Huisman, Prádanos e Hernández (2000) investigaram o efeito das interações entre proteínas e membranas durante a incrustação em processos de ultrafiltração. Os autores verificaram que as interações entre a membrana e as proteínas influenciam no início da ultrafiltração, sendo que as interações entre as proteínas somente têm importância durante os estágios posteriores do processo. Salienta-se que o fenômeno de incrustação é fundamentalmente dependente das condições de filtração utilizadas.

Hwang e Chiang (2014) realizaram a comparação de membranas de ultrafiltração com diferentes morfologias (éster de celulose, fluoreto de polivinilideno e policarbonato) para separar proteínas de polissacarídeos. Os autores verificaram um aumento no fluxo de permeado com o aumento da velocidade tangencial de alimentação e também com o aumento da pressão transmembrana. A incrustação ocorreu pela formação de agregado de proteínas na superfície da membrana e pela adsorção de polissacarídeos nos poros da membrana. Os maiores fluxos foram obtidos com a membrana de fluoreto de polivinilideno, embora a maior seletividade tenha sido obtida com a membrana de policarbonato, em virtude de apresentar maior uniformidade no tamanho dos seus poros e percentual bem menor de porosidade (HWANG; CHIANG, 2014).

A concentração de enzimas por ultrafiltração também vem sendo estudada com resultados promissores, como os de Lopes et al. (2009), que mantiveram 100 % da atividade enzimática da bromelina após ultrafiltração de suco de abacaxi, obtendo um fator de

concentração de dez vezes. Rodríguez-Fernández et al. (2013) concentraram a enzima fitase produzida por fermentação em estado sólido através de ultrafiltração com membrana de massa molar de corte de 10 kDa, obtendo um fator de concentração de 4,3 vezes, retenção de 100 % e rendimento de 86 %.

Golunski et al. (2011) realizaram a purificação de inulinasas produzidas por *Kluyveromyces marxianus* em fermentação em estado sólido utilizando precipitação com etanol e posterior ultrafiltração. A purificação com etanol proporcionou aumento de duas vezes na atividade e a ultrafiltração com membrana de polietersulfona de 100 kDa apresentou um fator de purificação de 5,5 vezes, com 86 % de rendimento. Estes resultados mostraram uma potencial aplicação de processos mais simples e rápidos para a purificação de enzimas.

Gottschalk, Bon e Nobrega (2008) avaliaram a concentração da enzima lignina peroxidase utilizando processos de ultrafiltração com membranas de polissulfona e acetato de celulose com massa molares de corte de 10 kDa, 20 kDa e 50 kDa. Os resultados mostraram uma elevada retenção (superior a 96 %) para as membranas de polissulfona de 10 kDa e 20 kDa, enquanto que a membrana de 50 kDa apresentou retenção de 58 %. O tempo de filtração desta última membrana foi de 30 minutos, enquanto que nas demais foi superior a uma hora, em virtude da diminuição do fluxo. A membrana de acetato de celulose de 20 kDa apresentou rejeição de 77 % e mostrou um menor decréscimo na permeabilidade total, sugerindo menor adsorção e bloqueio de poros nessa membrana. Os autores também verificaram que o aumento da pressão para 3 bar beneficiou o fluxo de permeado, mas diminuiu a estabilidade da enzima, diminuindo o rendimento do processo (GOTTSCHALK; BON; NOBREGA, 2008).

Novas membranas de ultrafiltração estão sendo desenvolvidas, a fim de controlar a seletividade para a separação de proteínas. Em um estudo desenvolvido para este fim foi efetuada uma alteração da estrutura de uma membrana de microfiltração de fibra oca de fluoreto de polivinilideno, a partir da aplicação de polivinilpirrolidona e posterior imersão em solução salina. A membrana obtida apresentou massa molar de corte de cerca de 100 kDa e mostrou alta capacidade de permeação, com um fluxo de água chegando a 590 L/(m<sup>2</sup>.h). De acordo com os autores a membrana desenvolvida pode ser utilizada na separação de proteínas focando no ponto isoelétrico da proteína de maior tamanho (LI et al., 2013).

Em outro estudo foi efetuada a modificação de membranas de ultrafiltração de polietersulfona com metacrilato de polietilenoglicol utilizando radiação ultravioleta. Os resultados mostraram que as membranas modificadas apresentaram fluxo permeado superior e maior estabilidade e seletividade para concentração e separação de albumina e mioglobina durante as seis horas de filtração, em relação às membranas convencionais, que tiveram sua

permeabilidade diminuída em 50 % após três ciclos de filtração e limpeza (PEEVA et al., 2012).

Valiño et al. (2014) modificaram uma membrana de ultrafiltração de celulose com massa molar de corte de 100 kDa, através da aplicação de cargas eletrostáticas e consequente aumento do potencial zeta da membrana. Os autores conseguiram separar as proteínas albumina e lactoferrina, embora tenham obtido fluxos de permeado muito baixos, e evidenciaram a necessidade de otimizar o processo através da modificação de outros parâmetros operacionais.

#### 2.2.8.1 Concentração de lipases por membranas

A utilização de ultrafiltração com membranas capilares para purificação de lipase proveniente de *Pseudomonas fluorescens* foi estudada por Sztajer e Bryjak (1989). No estudo foram testadas duas membranas (poliacrilonitrila e polissulfona) com massa molar de corte de 10 kDa, sendo que a primeira mostrou melhor comportamento para o fracionamento preliminar, pois 30 % da enzima foi recuperada no permeado, enquanto que a segunda proporcionou uma concentração mais efetiva, com 95 % de retenção.

Islam et al. (2009), realizaram a produção de lipase a partir de *Cirrhinus reba*, concentrando-a por ultrafiltração e purificando-a por cromatografia. A lipase produzida possuía 87 kDa de massa molar e foi extraída com solução tampão em pH 7,8, sendo posteriormente centrifugada, precipitada com sulfato de amônio, ressuspendida, dialisada, novamente centrifugada e então ultrafiltrada com uma membrana de 30 kDa. Após a purificação a atividade enzimática específica foi 34 vezes maior que no extrato bruto; entretanto o rendimento foi inferior a 50 %, evidenciando perdas no processo de purificação por cromatografia.

Em estudo realizado sobre a produção e purificação de lipases a partir de *Geobacillus* sp. realizou-se a centrifugação do caldo fermentado, sendo então efetuada a microfiltração com membrana de acetato de celulose a fim de retirar as células remanescentes. Após foi efetuada uma ultrafiltração com filtro de celulose com massa molar de corte de 10 kDa e posterior purificação utilizando cromatografia de troca iônica. Embora os autores tenham obtido resultados elevados de atividade enzimática no produto purificado (até 5,9 vezes superior) a quantidade de proteína foi muito inferior, mostrando perdas de 80 % durante o processo de ultrafiltração e de até 99 % na cromatografia (MUÑOZ; CORREA-LLANTÉN; BLAMEY, 2013).

Apesar do aumento no número de estudos relacionados à separação e purificação de proteínas, observa-se ainda elevada perda de enzimas quando são utilizados processos que envolvem precipitação, centrifugação e cromatografia. A utilização de processos de separação por membranas em série (microfiltração e ultrafiltração) pode propiciar uma diminuição no número de etapas de *downstream*, além de diminuir o uso de agentes químicos, possibilitando um aumento na velocidade do processo de produção de lipases e diminuindo seus custos de produção.

### **3 PRODUÇÃO DE LIPASES COM ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO POR *Aspergillus spp.* ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Os objetivos desta etapa do trabalho foram efetuar a seleção de fungos filamentosos produtores de lipases com atividade de esterificação, estudar as condições de produção dessas enzimas, determinar a especificidade por diferentes substratos e aplicar os extratos enzimáticos liofilizados como catalisadores em reações de síntese de ésteres etílicos de ácidos graxos.

#### **3.1 MATERIAL E MÉTODOS**

##### **3.1.1 Microrganismos e preparo do inóculo**

Foram utilizados 16 fungos filamentosos isolados por Colla et al. (2009), sendo 1 proveniente do Laboratório de Fermentações da Universidade de Passo Fundo (*Aspergillus fumigatus*), 5 oriundos de solo contaminado com óleo diesel e 10 oriundos de efluente de laticínios, pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Fusarium*.

Dos isolados estudados, o microrganismo que apresentou os melhores resultados nas etapas posteriores foi submetido à identificação genética no Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, utilizando a metodologia citada por Smaniotto et al. (2012).

Os fungos foram mantidos sob refrigeração em tubos de ensaio contendo ágar batata dextrose (ABD) inclinado, sendo realizada a repicagem das cepas a cada três meses. Para o preparo do inóculo foram adicionados de 10 mL de solução de Tween 80 (0,1 %) aos tubos de ensaio com ágar, realizando-se a raspagem dos esporos com alça de platina. O inóculo foi preparado adicionando-se 2,5 mL da suspensão de esporos obtida em erlenmeyers de 1 L contendo 100 mL de ABD, com posterior incubação a 30 °C durante 7 dias. Após o crescimento fúngico na superfície do ágar adicionaram-se 50 mL de Tween 80 (0,1 %), seguido de uma raspagem dos esporos e filtração em gaze estéril para retenção das hifas, conforme metodologia de Colla (2009).

### 3.1.2 Produção de lipases com atividade de esterificação e avaliação da especificidade por substrato

Os 16 microrganismos isolados foram utilizados para a seleção de fungos produtores de lipases com atividade de esterificação, uma vez que em estudos anteriores os mesmos apresentaram-se bons produtores de lipases com atividade de hidrólise (COLLA et al., 2009). Como primeira etapa realizou-se a fermentação em estado sólido segundo as condições de cultivo estudadas por Colla et al. (2010). Nesta etapa de seleção de microrganismos foi utilizada uma mistura de 85 % de farelo de soja e 15 % de casca de soja, totalizando 25 g de meio de cultivo, adicionado em béqueres de polipropileno de 600 mL, o qual foi tampado com manta acrílica hidrofóbica e autoclavado a 121 °C por 20 min, com posterior ajuste do pH do meio em 4,5 através da adição de uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5 mol/L. A umidade do meio foi ajustada para 60 % com água destilada estéril e adicionados 2 % de óleo de soja como indutor para a produção de lipases. A inoculação foi realizada com a adição de 1 mL da solução de esporos para cada béquer, correspondendo a uma concentração final de esporos de 10<sup>7</sup> esporos/g de substrato. Os frascos foram incubados em estufa a 30 °C sendo realizada a coleta das amostras para a determinação das atividades de esterificação nos tempos inicial (0 h) e após 96 h de fermentação. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Com as cepas que apresentaram maiores atividades enzimáticas para esterificação realizou-se uma nova fermentação em estado sólido, modificando-se o meio de produção para 80 % de farelo de soja e 20 % de casca de soja, 65 % de umidade final e adição de óleo de soja e ureia como indutor e fonte de nitrogênio, respectivamente, na concentração de 1 %, com base em estudos conduzidos por Rizzardi (2012). Estes novos ensaios de bioprodução tiveram a finalidade de avaliar a influência do pH do meio na produção de lipases, a forma de obtenção e extração das enzimas e a especificidade das lipases produzidas frente a diferentes ácidos graxos (butírico, láurico e oleico).

As enzimas foram obtidas de duas formas: através do processo convencional de extração com posterior liofilização do extrato, e através da liofilização direta do farelo fermentado, a fim de propor-se uma etapa a menos no processo de *downstream* da enzima. Para o processo de extração dos farelos fermentados foram adicionados tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L e pH 7,0 na razão 1:5 (10 g de meio fermentado para 50 mL de tampão) e incubados em banho termostático a 35 °C por 20 min e agitação de 160 rpm. Após a incubação, as amostras foram filtradas, utilizando-se funil de tecido de nylon para a obtenção do extrato enzimático bruto (VARGAS et al., 2008). O extrato enzimático e o farelo

fermentado foram distribuídos em camadas de 1 cm de espessura em placas de Petri e submetidos ao congelamento em liofilizador a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h (PERSSON et al., 2002), originando o extrato liofilizado (EL) e o farelo fermentado liofilizado (FFL). As amostras secas foram acondicionadas em frascos de vidro, lacrados, codificados e vedados com filme plástico (Parafilm<sup>®</sup>), sendo armazenadas sob refrigeração ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Um planejamento fatorial misto  $2^2.3^1$  foi conduzido para cada cepa fúngica selecionada na primeira etapa, conforme apresentado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Planejamento fatorial misto  $2^2.3^1$  utilizado para avaliar a influência do ajuste de pH do meio de cultivo, a forma de obtenção da enzima e do ácido graxo utilizado na reação de esterificação sobre a atividade de esterificação das lipases produzidas para os fungos *Aspergillus niger* O-4 e *Aspergillus fumigatus*

Experimento	pH	Forma de obtenção da enzima	Ácido graxo
1	6,2 (sem ajuste)	FFL (farelo fermentado liofilizado)	Butírico
2	4,5 (com ajuste)	FFL (farelo fermentado liofilizado)	Butírico
3	6,2 (sem ajuste)	EL (extrato liofilizado)	Butírico
4	4,5 (com ajuste)	EL (extrato liofilizado)	Butírico
5	6,2 (sem ajuste)	FFL (farelo fermentado liofilizado)	Láurico
6	4,5 (com ajuste)	FFL (farelo fermentado liofilizado)	Láurico
7	6,2 (sem ajuste)	EL (extrato liofilizado)	Láurico
8	4,5 (com ajuste)	EL (extrato liofilizado)	Láurico
9	6,2 (sem ajuste)	FFL (farelo fermentado liofilizado)	Oleico
10	4,5 (com ajuste)	FFL (farelo fermentado liofilizado)	Oleico
11	6,2 (sem ajuste)	EL (extrato liofilizado)	Oleico
12	4,5 (com ajuste)	EL (extrato liofilizado)	Oleico

### 3.1.3 Determinação da atividade de esterificação

A atividade de esterificação foi quantificada através da reação entre ácido graxo e etanol na razão molar de 1:1 (mistura padrão) (SILVA et al., 2011). A reação foi conduzida em erlenmeyers contendo 5 mL da mistura padrão e 0,1 g do farelo fermentado liofilizado (FFL) ou do extrato liofilizado (EL), após foram incubados em banho a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 40 min e agitação de 160 rpm. Alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  foram retiradas do meio reacional em triplicata e

adicionadas a 20 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para paralisar a reação. Após, a quantidade de ácido graxo consumido foi determinada através da titulação com NaOH 0,035 mol/L até atingir o pH 11,0. Os ensaios controles continham 20 mL da solução de acetona-etanol (1:1) e 500 µL da mistura padrão.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido graxo por minuto e calculada utilizando a Equação 3.1.

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \times M \times V_f \times 1000}{t \times m \times V_c} \quad (3.1)$$

Sendo:

*AE*: atividade de esterificação (U/g)

*V<sub>a</sub>*: volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL)

*V<sub>b</sub>*: volume de NaOH gasto na titulação do ensaio controle (mL)

*M*: concentração molar da solução de NaOH (mol/L)

*V<sub>f</sub>*: volume final de meio reacional (mL)

*t*: tempo de reação (min)

*m*: massa do extrato enzimático bruto liofilizado (g)

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

#### 3.1.4 Uso das enzimas em reação de alcoólise de óleo vegetal

A lipase obtida nas condições determinadas anteriormente foi utilizada para a reação de esterificação de óleo vegetal. O óleo de soja refinado (Bunge) foi escolhido como substrato a ser utilizado na alcoólise enzimática em solvente orgânico. Álcool etílico (Merck, 99 % de pureza) e n-hexano PA (Merck, 99 % de pureza) foram utilizados nos experimentos como substrato e solvente orgânico, respectivamente (FACCIO, 2004).

Para a reação de alcoólise foram utilizados 1 g de óleo de soja, 40 mL de solvente (n-hexano), 150 mg de etanol (razão molar óleo-álcool de 1:3) e 250 mg de extrato enzimático liofilizado ou farelo fermentado liofilizado. Os erlenmeyers contendo os reagentes foram colocados em agitador rotativo (*shaker*) a 200 rpm por 8 h, após, as amostras foram filtradas em papel filtro e levadas a evaporação do solvente em estufa na temperatura de 65 °C.

Para a determinação da conversão da reação transferiram-se 250 µL da amostra para balão volumétrico de 10 mL completando o volume com n-heptano. Após, transferiu-se uma

alíquota de 50 µL desta solução para um balão volumétrico de 1 mL (a fim de obter uma concentração próxima a 1000 mg/L) e adicionaram-se 50 µL de padrão interno (heptadecanoato de metila), completando-se o volume com o solvente n-heptano e obtendo-se uma concentração de 250 mg/L.

Esta solução (1 µL) foi injetada em duplicata em um cromatógrafo gasoso (CG/FID Shimadzu modelo GC 2010), com detector de ionização de chama equipado com injetor automático AOC-20i e uma coluna capilar RTX-Wax (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm), com as seguintes condições cromatográficas: temperatura inicial da coluna de 120 °C, permanecendo por 1 min nesta condição, aumentando-se a temperatura a uma taxa de 15 °C/min até 180 °C, permanecendo assim por 2 min, e aumentando novamente a uma taxa de 5 °C/min até 250 °C permanecendo 2 min nesta condição. Ar sintético e nitrogênio foram utilizados como gases de arraste e a temperatura do injetor e detector foram de 250 °C e a taxa de split de 1:50.

As amostras referentes a cada experimento foram preparadas em triplicata conforme descrito anteriormente. Utilizou-se a mesma metodologia de preparo das amostras para análise descrita por Silva (2010). As adaptações, em relação ao método oficial (CEN, 2011), foram testadas com base na amostra de biodiesel etílico de soja obtido pelo método de catálise alcalina utilizando hidróxido de sódio como catalisador, em condições de reação otimizadas por Faccio (2004). O cálculo do teor de ésteres etílicos da amostra foi obtido através da Equação 3.2 com base no método.

$$CV = \left[ \frac{(\sum A_i) - API}{API} \times \frac{CPI}{C_a} \right] \times 100 \quad (3.2)$$

Sendo:

*CV*: conversão em ésteres (%)

$\sum A_i$ : somatório das áreas correspondentes aos picos dos ésteres (C14:0 a C24:0) e do padrão interno (C17:0 – heptadecanoato de metila)

*API*: área do padrão interno (C17:0)

*CPI*: concentração do padrão interno na amostra injetada (mg/L)

*C<sub>a</sub>*: concentração da amostra injetada (mg/L)

## 3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.2.1 Seleção de microrganismos produtores de lipases com atividade de esterificação

Dos 5 fungos isolados de solo contaminado com óleo diesel apenas o fungo *Aspergillus niger* O-4 apresentou atividade de esterificação (reação entre ácido graxo e etanol), de  $364,58 \pm 0,30$  U/g. Os fungos isolados de efluente da indústria de laticínios não produziram lipases com atividade de esterificação, enquanto que o fungo *Aspergillus fumigatus* apresentou atividade de esterificação de  $182,92 \pm 0,47$  U/g.

As sequências de bases nitrogenadas do fungo *Aspergillus niger* O-4 foram comparadas aos dados (18S rRNA) obtidos no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A cepa foi identificada como *Aspergillus niger* cepa DAOM (100% de identidade, código de acesso no *GenBank*: KC545858.1).

Colla et al. (2009) estudaram a seleção de fungos filamentosos (a partir de efluente de laticínios e solo contaminado com óleo diesel) produtores de lipases com atividade hidrolítica através de fermentação em estado sólido. O fungo *Aspergillus niger* O-4 foi um dos melhores microrganismos produtores de lipases com atividade hidrolítica, com máxima atividade de 45,49 U/g. No presente estudo observou-se que o fungo *Aspergillus niger* O-4 também foi o microrganismo que se apresentou como o melhor produtor de lipase com atividade de esterificação.

Fungos do gênero *Aspergillus* têm sido citados como produtores de lipases (TREICHEL et al., 2010). Entre as cepas de *Aspergillus* estudadas neste trabalho o *Aspergillus niger* tem sido estudado para a produção de lipases com mais frequência que o *Aspergillus fumigatus*. O estudo de lipases produzidas por *Aspergillus fumigatus* é mais recente, sendo citado como produtor de lipases por Brooks e Asamudo (2011), Rajan e Nair (2011).

A partir dos ensaios de seleção dos microrganismos potenciais foi realizada a modificação do meio do cultivo em virtude de no processo de seleção terem sido utilizadas condições de cultivo previamente otimizadas para a produção de lipases com atividade de hidrólise (COLLA et al., 2009). Rizzardì (2012) obteve resultados significativos de atividade enzimática para as condições de 65 % de umidade, proporção farelo:casca de 80:20 e adição de 1 % de óleo de soja e ureia, sendo estas condições de cultivo, portanto, utilizadas na sequência dos experimentos.

### 3.2.2 Avaliação da especificidade por diferentes ácidos graxos

A Tabela 3.2 apresenta as atividades de esterificação das enzimas produzidas pelos fungos *Aspergillus niger* O-4 e *Aspergillus fumigatus* em 96 h de fermentação, nos planejamentos fatoriais utilizados para avaliar a influência do ajuste de pH do meio de cultivo, do método de extração da enzima e do ácido graxo utilizado na reação de esterificação. Os experimentos realizados sem ajuste de pH apresentaram valor igual a 6,2.

Tabela 3.2 – Resultados do planejamento fatorial misto 2<sup>2</sup>.3<sup>1</sup> utilizado sobre a atividade de esterificação das lipases produzidas para os fungos *Aspergillus niger* O-4 e *Aspergillus fumigatus*

Experimento	pH	Forma da enzima	Ácido graxo	AE (U/g)* <i>Aspergillus niger</i> O-4	AE (U/g)* <i>Aspergillus fumigatus</i>
1	6,2	FFL	Butírico	661,43 ± 15,93 <sup>d</sup>	410,75 ± 25,88 <sup>b</sup>
2	4,5	FFL	Butírico	125,47 ± 16,73 <sup>ab</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
3	6,2	EL	Butírico	514,19 ± 52,29 <sup>cd</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
4	4,5	EL	Butírico	78,04 ± 24,53 <sup>ab</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
5	6,2	FFL	Láurico	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
6	4,5	FFL	Láurico	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
7	6,2	EL	Láurico	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
8	4,5	EL	Láurico	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
9	6,2	FFL	Oleico	451,50 ± 0,00 <sup>c</sup>	374,55 ± 0,00 <sup>b</sup>
10	4,5	FFL	Oleico	185,52 ± 56,09 <sup>b</sup>	395,43 ± 8,41 <sup>b</sup>
11	6,2	EL	Oleico	450,59 ± 17,46 <sup>c</sup>	374,88 ± 7,97 <sup>b</sup>
12	4,5	EL	Oleico	119,39 ± 59,69 <sup>ab</sup>	375,48 ± 12,65 <sup>b</sup>

AE: atividade de esterificação

FFL: farelo fermentado liofilizado; EL: extrato liofilizado

\*Resultados de média ± desvio-padrão. Médias seguidas de letras diferentes na coluna apresentam diferença significativa entre si através do teste de Tukey com um nível de significância de 5%.

As enzimas produzidas a partir do *Aspergillus niger* O-4 (Tabela 3.2) apresentaram atividade frente aos ácidos oleico (C18:1) e butírico (C4:0) na presença de etanol, não apresentando atividade com a utilização do ácido láurico (C12:0). As enzimas produzidas pelo *Aspergillus fumigatus* não apresentaram atividades de esterificação frente ao ácido láurico, assim como as enzimas produzidas pelo *Aspergillus niger* O-4, apresentando atividade frente

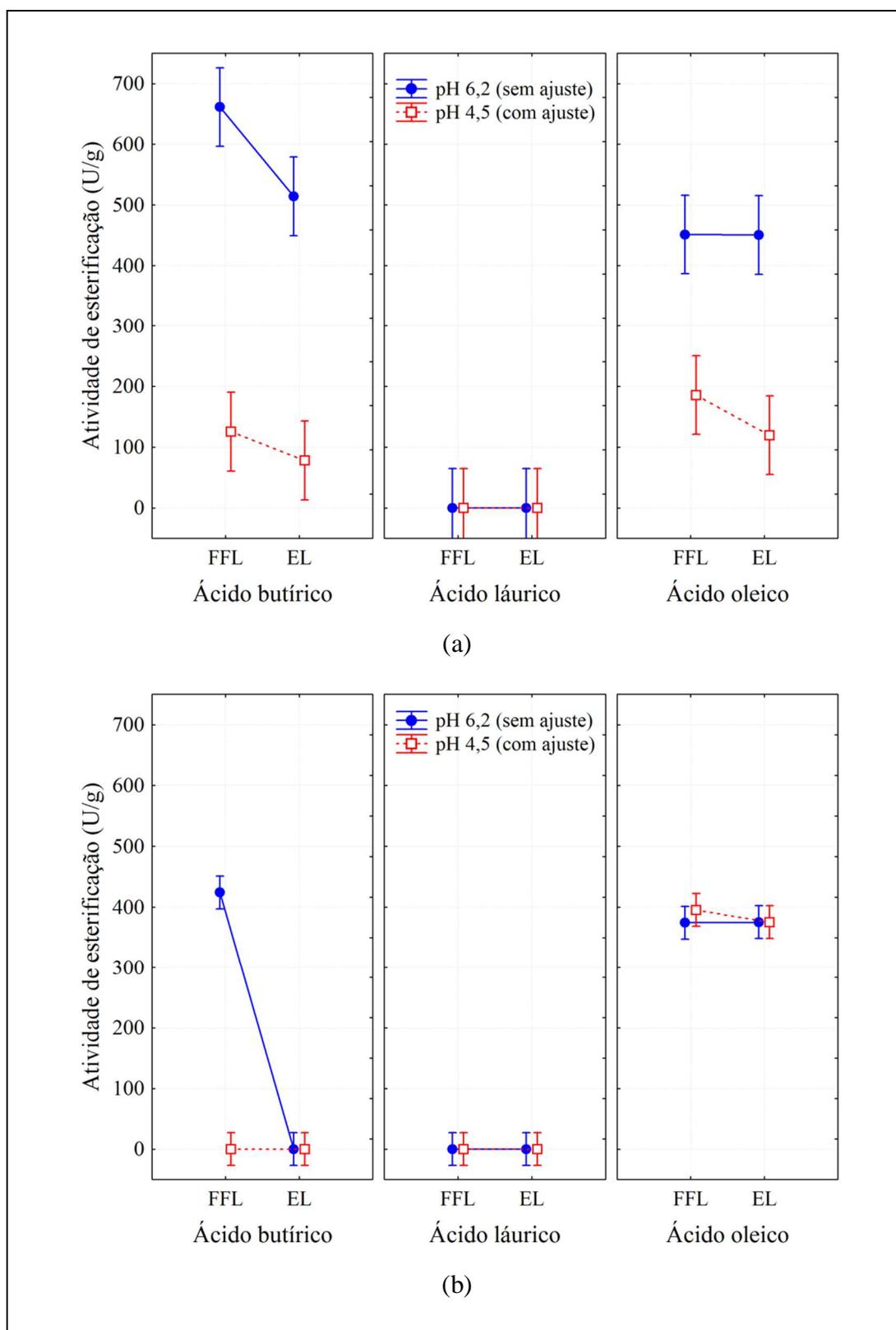
ao ácido de cadeia curta somente no experimento 1, realizado sem o ajuste do pH do meio de cultivo para 4,5 e utilizando o farelo fermentado liofilizado sem a etapa de extração como fonte de enzimas.

A análise de variância dos resultados para o fungo *Aspergillus niger* O-4 demonstrou que a interação dos três fatores estudados (ajuste de pH, forma de obtenção da enzima e tipo de ácido graxo utilizado) foi significativa ( $p < 0,0001$ ), devendo ser analisada. Verifica-se na Figura 3.1(a) que o ajuste do pH do meio de cultivo ocasionou diminuição na atividade frente ao ácido butírico e frente ao ácido oleico. A liofilização direta do farelo fermentado e o uso deste na reação de esterificação permitiu maiores atividades de esterificação frente ao ácido butírico. Em relação à reação com o ácido oleico a atividade de esterificação foi igual ( $p > 0,05$ ) quando comparado o uso do farelo fermentado liofilizado e do extrato liofilizado. A atividade de esterificação obtida para o ácido butírico (661,43 U/g) foi significativamente superior ( $p = 0,0099$ ) à obtida para o ácido oleico (451,50 U/g) na condição de cultivo sem o ajuste de pH.

A análise de variância dos resultados para o fungo *Aspergillus fumigatus* também demonstrou que a interação dos três fatores estudados (ajuste de pH, forma de obtenção das enzimas e tipo de ácido graxo utilizado) foi significativa ( $p < 0,0001$ ), devendo ser analisada. Verifica-se na Figura 3.1(b) que utilizando o ácido butírico como substrato na reação de esterificação, somente foi observada atividade (410,75 U/g) na condição de cultivo sem o ajuste do pH do meio de cultivo e utilizando-se o farelo fermentado liofilizado diretamente na reação, sem a etapa prévia de extração da enzima, sendo esse resultado semelhante ( $p > 0,05$ ) aos obtidos com a utilização do ácido oleico como substrato, independente das condições de cultivo utilizadas (atividades em torno de 380 U/g).

As enzimas produzidas pelos dois fungos filamentosos apresentaram comportamento semelhante em relação à ausência de especificidade pelo ácido láurico, sendo que o *Aspergillus niger* O-4 produziu lipases com maior especificidade para o ácido butírico (C4:0), enquanto que o *Aspergillus fumigatus* produziu lipases com maior especificidade para o ácido oleico (C18:1). Considera-se que ao justificarem-se estes resultados deva-se levar em consideração o tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo e a presença da instauração, pois as lipases produzidas por microrganismos podem apresentar estruturas químicas diferentes, levando a resultados distintos de especificidade e potencial catalítico.

Figura 3.1 – Atividade de esterificação das enzimas liofilizadas produzidas por (a) *Aspergillus niger* O-4 e (b) *Aspergillus fumigatus*, com pH do meio de cultivo ajustado ou não e a partir de diferentes formas de obtenção da enzima liofilizada (FFL: farelo fermentado liofilizado, EL: extrato liofilizado)



Fonte: elaborada pelo autor.

No estudo da influência da dupla ligação (comparando os rendimentos do C18:0 e C18:1), Bezbradica et al. (2006), utilizando a lipase produzida pela *Candida rugosa* em meio reacional com 2,2,4 trimetilpentano, em condições equimolares dos substratos (álcool utilizado: 3-metil-butanol), verificaram que a síntese do éster de ácido graxo insaturado (C18:1) foi duas vezes mais rápida, demonstrando uma afinidade maior dessa lipase por ácidos graxos insaturados, cuja solubilidade é maior em comparação com ácidos graxos saturados. No entanto, deve-se considerar que a solubilidade dos ácidos graxos é também dependente do número de carbono das moléculas, sendo que quanto menor o comprimento da cadeia, maior a sua solubilidade em água.

Em estudo realizado por Sun, Xu e Wang (2009) a não linearidade da especificidade em relação ao tamanho da cadeia carbônica foi demonstrada em resultados obtidos somente com ácidos graxos saturados. A lipase utilizada foi produzida por *Rhizopus chinensis* em fermentação em estado sólido e o sistema reacional consistiu na utilização de n-heptano, ácidos e álcoois em concentrações de 0,6 mol/L. Os ácidos graxos utilizados foram de C4:0 a C16:0 e os álcoois primários do metanol ao 1-octanol. Os resultados obtidos para os ésteres etílicos formados indicaram maior afinidade da enzima pelos ácidos graxos na seguinte ordem, considerando-se as conversões no tempo final de reação: caprílico (C8:0) > láurico (C12:0) > mirístico (C14:0) > palmítico (C16:0) > cáprico (C10:0) > caproico (C6:0). Verifica-se, no entanto, que nesse estudo o ácido láurico foi o que apresentou a segunda maior atividade, utilizando como aceptor de elétrons o mesmo álcool deste trabalho (etanol).

Resultado semelhante ao anterior em relação à especificidade pelos ácidos graxos foi obtido por Vaidya, Gera e Ramakrishna (2008), os quais relataram estudo de especificidade utilizando enzimas comerciais imobilizadas. A enzima de *Candida antarctica* imobilizada em resina de acrilato apresentou melhores resultados de atividade específica quando o ácido graxo utilizado foi o ácido láurico, o que foi explicado pela resistência da difusão de substratos de cadeia longa na estrutura mais rígida das enzimas imobilizadas.

Bezbradica et al. (2006) mencionam que vários fatores podem influenciar na afinidade por ácidos graxos de cadeia curta e longa, como os relacionados à termodinâmica da reação, visto que a formação do éster, obtida após a clivagem do complexo acil-enzima pelo etanol, pode apresentar uma conversão baixa, ou ainda pela premissa de que as lipases possuem regiões hidrofílicas (para ácidos graxos de cadeia curta, com até 6 átomos de carbono) e hidrofóbicas (para ácidos graxos de cadeia longa, com mais de 6 átomos de carbono) ao redor do sítio catalítico.

Segundo Zaidi et al. (2002), Naik et al. (2010) e Pleiss, Fischer e Schmid (1998) cada lipase pode ter um comportamento diferenciado. A especificidade enzimática está relacionada com o caráter eletrofílico do carbono na molécula doadora de acila, da acidez, do efeito estérico, da proporção dos substratos e da hidrofobicidade do grupo carboxílico. Assim, a fonte de lipases, o método de imobilização, a natureza do solvente e as propriedades dos substratos podem explicar, segundo os autores, as tendências conflitantes encontradas na literatura para os estudos de especificidade.

Silva et al. (2011), em estudo da especificidade em termos de atividade de esterificação das enzimas produzidas por *Penicillium brevicompactum* em fermentação em estado sólido, relataram que o ácido oleico (em combinação com o etanol) apresentou melhores resultados do que com o uso de outros álcoois (metanol, propanol e butanol), enquanto que o ácido butírico apresentou maiores atividades com etanol e butanol. O ácido láurico, por sua vez, apresentou melhores resultados quando do uso do butanol como álcool na reação de esterificação (SILVA, 2010). Verifica-se desta forma que as baixas atividades de esterificação obtidas neste trabalho, quando utilizado o ácido láurico, podem estar relacionadas ao uso do etanol.

Além disso, outro fator que pode justificar as maiores atividades de esterificação obtidas com o ácido oleico é a possível preferência da enzima por ácidos graxos semelhantes aos presentes nos substratos de produção, como é o caso deste trabalho, no qual o óleo de soja foi utilizado como indutor para a síntese de enzimas. Resultados semelhantes foram obtidos por Silva et al. (2011) e Rigo et al. (2012).

### 3.2.3 Alcoólise de óleo vegetal

A Tabela 3.3 apresenta as conversões obtidas na alcoólise enzimática do óleo de soja com hexano como solvente orgânico para as lipases produzidas pelos fungos *Aspergillus niger* O-4 e *Aspergillus fumigatus*.

As lipases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger* O-4 mostraram uma conversão em ésteres etílicos entre 0,75 % e 5,32 %, enquanto que as lipases oriundas do fungo *Aspergillus fumigatus* levaram a conversões que variaram entre 1,57 % e 2,55 %. A maior conversão em ésteres etílicos foi obtida através das lipases oriundas do extrato liofilizado que foram produzidas por *Aspergillus niger* O-4 quando o pH do meio de cultivo foi ajustado para 4,5.

Tabela 3.3 – Conversões em ésteres obtidas na alcoólise enzimática do óleo de soja com hexano como solvente orgânico para as lipases produzidas pelos fungos *Aspergillus niger* O-4 e *Aspergillus fumigatus*

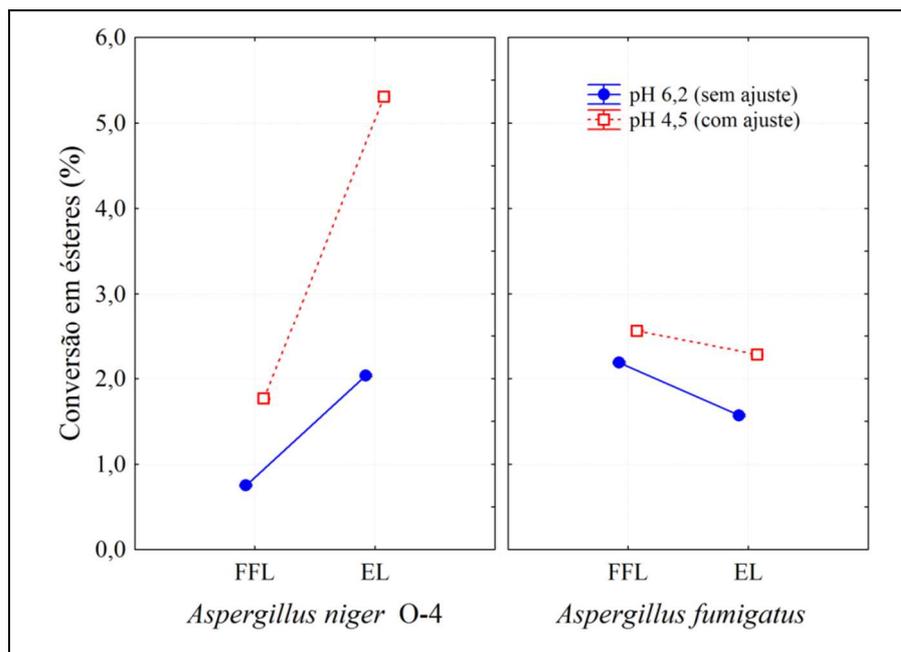
Experimento	pH do meio	Forma da enzima	Microrganismo	Conversão (%)*
1	6,2	FFL	<i>A. niger</i> O-4	0,75 ± 0,008 <sup>a</sup>
2	4,5	FFL	<i>A. niger</i> O-4	1,76 ± 0,012 <sup>c</sup>
3	6,2	EL	<i>A. niger</i> O-4	2,04 ± 0,004 <sup>d</sup>
4	4,5	EL	<i>A. niger</i> O-4	5,32 ± 0,001 <sup>h</sup>
5	6,2	FFL	<i>A. fumigatus</i>	2,19 ± 0,001 <sup>e</sup>
6	4,5	FFL	<i>A. fumigatus</i>	2,55 ± 0,007 <sup>g</sup>
7	6,2	EL	<i>A. fumigatus</i>	1,57 ± 0,005 <sup>b</sup>
8	4,5	EL	<i>A. fumigatus</i>	2,28 ± 0,001 <sup>f</sup>

FFL: farelo fermentado liofilizado; EL: extrato liofilizado

\*Resultados de média ± desvio-padrão. Médias seguidas de letras diferentes na coluna apresentam diferença significativa entre si através do teste de Tukey com um nível de significância de 5%.

A análise de variância dos resultados de conversão em ésteres etílicos de ácidos graxos demonstrou que todos os fatores foram significativos sobre as conversões ( $p < 0,0001$ ), sendo que a Figura 3.2 apresenta o gráfico de interação das médias obtidas.

Figura 3.2 – Conversões em ésteres obtidas a partir das lipases produzidas em fermentação em estado sólido por *Aspergillus niger* O-4 e *Aspergillus fumigatus* (FFL: farelo fermentado liofilizado, EL: extrato liofilizado)



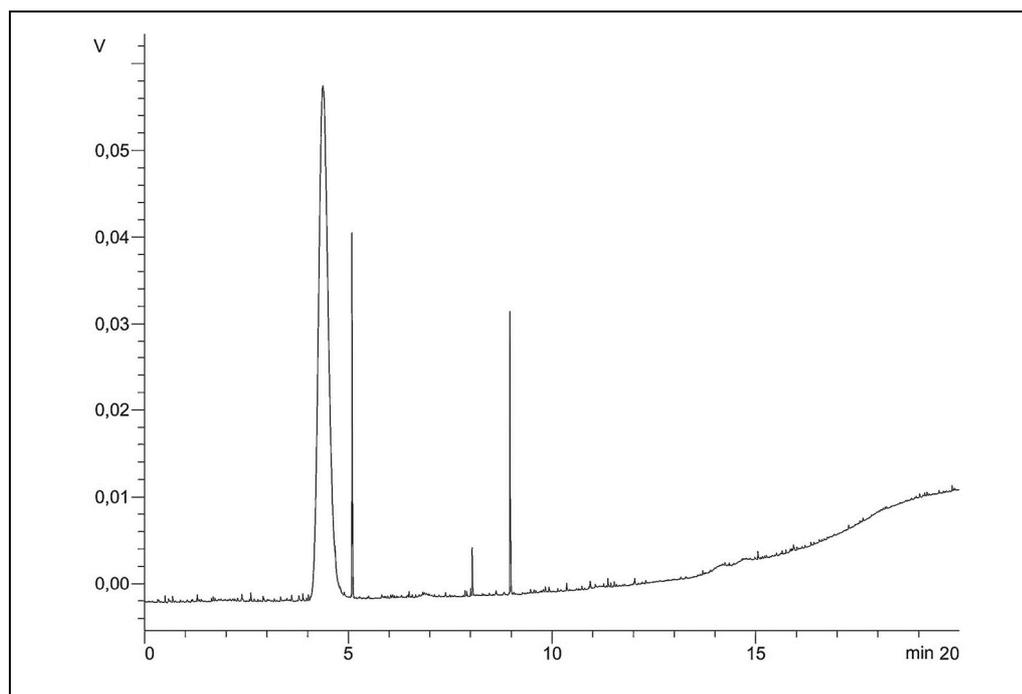
Fonte: elaborada pelo autor.

As conversões obtidas pelas enzimas produzidas pelos fungos foram maiores realizando-se a produção da enzima em meio de cultivo com ajuste de pH. Maiores conversões foram obtidas utilizando o extrato liofilizado para o fungo *Aspergillus niger* O-4 e utilizando o farelo fermentado liofilizado (sem a extração da enzima em meio líquido) para o *Aspergillus fumigatus*.

Estes resultados são diferentes dos obtidos anteriormente, quando houve maior atividade de esterificação para as lipases produzidas com pH 6,2. Deve-se salientar o fato da esterificação ter envolvido uma reação direta de um ácido graxo com um álcool, enquanto que na alcoólise ocorreu a reação inicial de hidrólise do triacilglicerol para depois ocorrer a esterificação propriamente dita, reação que pode ter sido beneficiada pelas características das lipases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger* O-4 em condições de pH modificado.

A Figura 3.3 apresenta o cromatograma obtido no experimento que apresentou a maior conversão em ésteres etílicos. Pode-se observar que o primeiro pico apresentado (tempo de retenção de 4,4 min) corresponde ao padrão interno (C17:0) e ao ácido esteárico (C18:0), enquanto que os picos seguintes são relativos aos ácidos oléico (C18:1, tempo de retenção de 5,1 min), linoléico (C18:2, tempo de retenção de 8,0 min) e linolênico (C18:3 tempo de retenção de 9,0 min).

Figura 3.3 – Cromatograma com a identificação dos ésteres etílicos produzidos a partir do experimento utilizando o extrato liofilizado obtido com o fungo *Aspergillus niger* O-4 no cultivo com pH 4,5



Fonte: elaborada pelo autor.

Em um trabalho realizado por Froehner, Leithold e Lima Jr. (2007) sobre a transesterificação de óleos vegetais a composição média do óleo de soja utilizado apresentou entre 12,4 % e 12,8 % de C16:0, entre 3,4 % e 3,7 % de C18:0, entre 26,0% e 27,0 % de C18:1; entre 46,6 % e 50,3 % de C18:2 e entre 8,5 % e 10,6 % de C18:3. Os resultados desta tese, evidenciados na Figura 3.3, mostraram que houve maior formação de éster do ácido oleico, apesar do óleo original apresentar maior concentração de ácido linoleico. A maior produção de ésteres etílicos de C18:1 e de C18:3, ao invés de ésteres de C18:2, provocou uma menor taxa de conversão, evidenciando uma maior especificidade das enzimas produzidas no processo fermentativo por este ácido graxo insaturado, conforme resultados obtidos na etapa anterior do trabalho.

Em um trabalho realizado por Ferrari, Oliveira e Scabio (2005), utilizando catalisador alcalino, obteve-se a formação de ésteres etílicos para produção de biodiesel de soja com a seguinte composição: 11,3 % de C16:0, 3,5 % de C18:0, 22,5 % de C18:1, 54,6 % de C18:2 e 8,1 % de C18:3, apresentando uma composição compatível com o óleo utilizado. Embora o rendimento médio desse processo tenha sido de 57,3 %, o uso de catalisadores químicos pode provocar problemas de corrosão e formação de produtos de saponificação quando há ácidos graxos livres, o que não ocorre utilizando catalisadores enzimáticos.

As conversões em ésteres etílicos foram inferiores às obtidas por outros autores, como Aguierras, Souza e Langone (2013) e Skoronski et al. (2013), os quais obtiveram rendimentos superiores a 90 % com enzimas comerciais ou imobilizadas, respectivamente. Os resultados deste trabalho podem ser atribuídos à utilização das condições de alcoólise otimizadas por Faccio (2004) para a enzima comercial (Novozym 435). Melhores resultados podem ser obtidos fazendo-se ajustes nesta metodologia, como: aumentar a quantidade de enzima, tipo de triacilglicerol, tempo de reação e solvente. A razão molar óleo:álcool é uma das variáveis mais importantes que afetam o rendimento de ésteres de ácidos graxos. Kusdiana e Saka (2001) sugerem que razões molares mais altas de óleo:álcool resultem em uma reação de transesterificação mais eficiente, devido ao aumento da área de contato entre álcool e triacilgliceróis.

As conversões obtidas por Silva et al. (2011) foram de 15,6 %, para uma enzima precipitada obtida a partir da torta de babaçu por *Penicillium brevicompactum*, e 6,5 % para uma enzima precipitada a partir de farelo de mamona por *Penicillium brevicompactum*. A purificação da enzima por precipitação, bem como a imobilização das enzimas em alginato de sódio e carvão ativado, podem ter contribuído para as maiores conversões. Dessa forma, para ocorrer um aumento nas conversões das enzimas utilizadas neste trabalho, podem-se

empregar métodos como precipitação ou imobilização, as quais podem preservar a atividade da enzima. Diferentes sistemas reacionais também podem ser testados visando ao aumento da conversão do processo.

Predabom (2011) realizou a alcoólise enzimática de diferentes óleos vegetais utilizando lipase de *Penicillium brevicompactum* fermentada em diferentes misturas de farelo. As maiores conversões foram obtidas na amostra de extrato utilizando a mistura de farelo de arroz e casca de arroz (2,88 %) e na amostra de extrato da mistura de farelo de soja e casca de soja (2,48 %), ambas utilizando óleo de oliva como substrato para a alcoólise. As conversões obtidas neste trabalho foram semelhantes.

Apesar das taxas de conversão obtidas neste trabalho não terem sido tão altas, deve-se salientar que as enzimas não sofreram processos avançados de purificação e/ou imobilização, indicando que é possível otimizar as condições de operação para que a utilização dessas enzimas produzidas por fungos com resíduos agroindustriais possa ser aplicada na processos biotecnológicos, como a produção de biodiesel.

### 3.3 CONCLUSÕES DESTA ETAPA

Dos 16 fungos inicialmente testados apenas dois (*Aspergillus niger* O-4 e *Aspergillus fumigatus*) apresentaram atividade de esterificação (364,58 U/g e 182,92 U/g, respectivamente).

As enzimas produzidas pelos dois fungos não apresentaram atividade de esterificação frente ao ácido láurico. As lipases de *A. niger* O-4 apresentaram maior atividade de esterificação para o ácido butírico do que para o ácido oleico na presença de etanol, sendo que para estes dois ácidos graxos houve maior atividade quando as enzimas foram produzidas em pH 6,2. As lipases produzidas pelo fungo *A. fumigatus* apresentaram maior atividade de esterificação frente ao ácido oleico, independentemente do pH do meio e da forma de obtenção da enzima, e frente ao ácido butírico, quando foi efetuado o cultivo em pH 6,2 e aplicado diretamente o farelo fermentado liofilizado.

As conversões em ésteres etílicos obtidas pelas enzimas produzidas pelos fungos foram maiores realizando-se a produção da enzima em meio de cultivo com pH 4,5. As maiores conversões (5,3%) foram obtidas utilizando o extrato liofilizado do cultivo efetuado com o fungo *Aspergillus niger* O-4.

## **4 PRODUÇÃO DE LIPASES COM ATIVIDADE DE HIDRÓLISE POR *Aspergillus* spp. ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Os objetivos desta etapa do trabalho foram produzir lipases com atividade de hidrólise a partir de fungos filamentosos utilizando resíduos agroindustriais, padronizar a metodologia para determinação da atividade enzimática, selecionar indutores e investigar a influência da concentração do indutor e da umidade do processo conduzido via fermentação em estado sólido.

### **4.1 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1.1 Microrganismos**

Os fungos utilizados nesta parte do trabalho foram do gênero *Aspergillus*, sendo: cepa O-4, previamente isolada por Colla et al. (2009) de solo contaminado com óleo diesel e selecionada como boa produtora de lipases através de fermentação em estado sólido; cepas *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*, pertencentes ao banco de cepas do Laboratório de Fermentações da Universidade de Passo Fundo.

A cepa O-4 foi submetida à identificação genética no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Cena) da Universidade de São Paulo, utilizando a metodologia citada por Smaniotto et al. (2012). As sequências de bases nitrogenadas da cepa O-4 foram comparadas aos dados (18S rRNA) obtidos no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A cepa foi identificada como *Aspergillus niger* cepa DAOM (100% de identidade, código de acesso no *GenBank*: KC545858.1) (REINEHR et al., 2014).

#### **4.1.2 Manutenção e preparo do inóculo**

As cepas foram mantidas a 4 °C em tubos de ensaio com ágar batata dextrose (ABD), com repicagens periódicas a cada três meses.

Para o preparo do inóculo foram adicionados 10 mL de solução de Tween 80 (0,1 %) aos tubos de ensaio com ágar, realizando-se a raspagem dos esporos com alça de platina. O inóculo foi preparado adicionando-se 2,5 mL da suspensão de esporos obtida em erlenmeyers

de 1 L contendo 100 mL de ABD, com posterior incubação a 30 °C durante 7 dias. Após o crescimento fúngico na superfície do ágar adicionaram-se 50 mL de Tween 80 (0,1 %), seguido de uma raspagem dos esporos e filtração em gaze estéril para retenção das hifas, seguindo metodologia descrita por Colla (2009).

#### 4.1.3 Seleção do meio de cultivo

Em uma primeira etapa foram preparados dois meios de cultivo utilizando resíduos agroindustriais: um meio foi preparado com 85 % de farelo de soja e 15 % de casca de soja, enquanto que outro meio foi preparado com 85 % de farelo de trigo e 15 % de casca de arroz, conforme Colla (2009). O farelo foi utilizado como suporte e fonte de nutrientes e a casca foi utilizada para aumentar a porosidade do meio e facilitar a transferência de oxigênio.

Em béqueres de polipropileno de 600 mL foram adicionados 25 g da mistura de cada meio de cultivo, sendo então tampados com manta acrílica hidrofóbica. Os meios de cultivo foram autoclavados a 121 °C por 20 min. A umidade foi ajustada a 65 % pela adição de água destilada estéril, sendo também adicionados 2 % de óleo de soja como indutor, de acordo com Colla (2009).

Nesta etapa foi realizada a inoculação do fungo *Aspergillus niger* O-4 (que apresentou os melhores resultados de produção de lipase no estudo anterior) com a adição de 1 mL da solução de esporos para cada béquer, correspondendo a uma concentração final de esporos de  $10^7$  esporos/g de substrato.

Os experimentos (realizados em duplicata) foram incubados em estufa a 30 °C por 6 dias (144 h), conforme Colla (2009), sendo então efetuada a coleta das amostras para a determinação da atividade de hidrólise.

#### 4.1.4 Extração das lipases

As enzimas foram extraídas seguindo a metodologia de Colla (2009), utilizando a proporção de 1 g de farelo fermentado e 10 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L (pH 7,0). Os frascos foram submetidos à agitação a 160 rpm por 30 min a 37 °C, após, filtrou-se em algodão para a remoção de sólidos suspensos, obtendo-se os extratos enzimáticos brutos.

#### 4.1.5 Padronização da metodologia para determinação da atividade de hidrólise

A determinação da atividade de hidrólise foi baseada na titulação com hidróxido de sódio dos ácidos graxos livres liberados pela ação da lipase presente no extrato enzimático sobre os triacilgliceróis do azeite de oliva emulsionados em goma arábica em presença de solução tampão. Em alguns trabalhos os autores realizaram essa determinação utilizando uma proporção de 1:3 (v/v) de azeite de oliva e solução de goma arábica, enquanto que outros utilizaram uma proporção de 1:1 (v/v). Além disso, nos trabalhos verificou-se uma falta de padronização no uso da solução tampão fosfato de sódio (pH 7,0), sendo utilizada nas concentrações de 0,2 mol/L, 0,1 mol/L, 0,05 mol/L e 0,01 mol/L (BURKERT; MAUGERI; RODRIGUES, 2004; BURKERT et al., 2005; AGUIAR et al., 2010; ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010; LOPES et al., 2011; TAVARES et al., 2011; MALDONADO et al., 2012; COLLA et al., 2014; XIE; WANG, 2014).

Em virtude do método titulométrico tradicional para determinação da atividade de hidrólise ter sido efetuado sob diferentes condições por diversos autores, propôs-se padronizar a metodologia no que diz respeito ao uso da emulsão e da solução tampão durante a análise. A Tabela 4.1 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo utilizado e respectivos níveis, levando-se em conta os parâmetros citados pelos autores.

Tabela 4.1 – Matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$  utilizado para a padronização da metodologia para determinação da atividade de hidrólise das lipases

Experimento	Emulsão da análise	Concentração da solução tampão
1	A	0,1 mol/L
2	B	0,1 mol/L
3	A	0,01 mol/L
4	B	0,01 mol/L

Emulsão A: 25 % de azeite de oliva e 75 % de solução de goma arábica 7 %

Emulsão B: 50 % de azeite de oliva e 50 % de solução de goma arábica 7 %

Em frascos de 250 mL foram adicionados 2 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7,0) (0,1 mol/L ou 0,01 mol/L), 5 mL de emulsão de azeite de oliva e goma arábica a 7 % (proporção de 1:3 ou de 1:1). A este sistema foi adicionado 1 mL de extrato enzimático e colocado a 37 °C durante 30 min. Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de 15

mL de solução de acetona e etanol (1:1) com posterior titulação dos ácidos graxos liberados com uma solução de hidróxido de sódio 0,01 mol/L até atingir pH 11.

Uma unidade de atividade de hidrólise foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto por grama de farelo fermentado úmido (1 U/g = 1  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ), nas condições do ensaio, conforme a Equação 4.1.

$$AH = \frac{(V_a - V_b) \times M \times V_e \times 1000}{t \times m \times V_r} \quad (4.1)$$

Sendo:

$AH$ : atividade de hidrólise (U/g)

$V_a$ : volume de NaOH titulado com a amostra (mL)

$V_b$ : volume de NaOH titulado com o branco (mL)

$M$ : concentração molar da solução de NaOH (mol/L)

$V_e$ : volume total de extrato (mL)

$t$ : tempo de reação (min)

$m$ : massa de amostra (g)

$V_r$ : volume da alíquota de extrato utilizada na reação (mL)

#### 4.1.6 Seleção de microrganismos e indutores

Após a definição do meio de cultivo com resultados mais promissores em relação à atividade de hidrólise das lipases produzidas, buscou-se produzir novamente as enzimas, desta vez utilizando também outros fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* e avaliando a possibilidade de utilizar indutores com menor custo, como o óleo de soja e o glicerol (subproduto da produção de biodiesel). Nesta segunda etapa foi realizado um planejamento fatorial completo  $3^2$ , analisando o tipo de microrganismo (*A. fumigatus*, *A. niger* e *A. niger* O-4) e o indutor (óleo de soja, glicerol e mistura de ambos), totalizando 9 condições experimentais distintas, conforme apresentado na Tabela 4.2.

As condições de cultivo foram as mesmas apresentadas anteriormente no item 4.1.3, sendo que os experimentos (realizados em duplicata) foram incubados em estufa a 30 °C por 6 dias (144 h), quando foi efetuada a coleta das amostras para a determinação da atividade de hidrólise de acordo com a metodologia padronizada.

Tabela 4.2 – Matriz do planejamento fatorial completo  $3^2$  utilizado para a seleção de fungos e indutores por fermentação em estado sólido

Experimento	Microrganismo	Indutor
1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	OS (2 %)
2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	G (1 %)
3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	OS (2 %) e G (1 %)
4	<i>Aspergillus niger</i>	OS (2 %)
5	<i>Aspergillus niger</i>	G (1 %)
6	<i>Aspergillus niger</i>	OS (2 %) e G (1 %)
7	<i>Aspergillus niger</i> O-4	OS (2 %)
8	<i>Aspergillus niger</i> O-4	G (1 %)
9	<i>Aspergillus niger</i> O-4	OS (2 %) e G (1 %)

OS: óleo de soja; G: glicerol.

#### 4.1.7 Efeito da umidade e da concentração de indutor

De acordo com os resultados obtidos no planejamento fatorial completo  $3^2$  realizou-se uma terceira etapa, através de um planejamento fatorial completo  $2^2$  com três pontos centrais, estudando-se a influência da umidade (60 %, 65 % e 70 %) e da concentração de indutor (0 %, 2 % e 4 %), totalizando sete condições experimentais (Tabela 4.3). Os experimentos foram incubados em estufa a 30 °C, sendo realizada a coleta das amostras para a determinação da atividade de hidrólise (realizada em triplicata) após 6 dias (144 h) de fermentação.

Tabela 4.3 – Matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$  com 3 pontos centrais utilizado na avaliação do efeito da umidade e da concentração de indutor com um dos fungos estudados

Experimento	Umidade (%)	Concentração de indutor (%)
1	60	0
2	70	0
3	60	4
4	70	4
5	65	2
6	65	2
7	65	2

#### 4.1.8 Determinação da produtividade

Após a realização dos experimentos da terceira etapa foi determinada a capacidade do fungo produzir enzimas em função do tempo. A produtividade enzimática foi definida em unidades de atividade de hidrólise por tempo (U/d), sendo calculada através da Equação 4.2.

$$P = \frac{AH_{t_f} - AH_{t_i}}{t_f - t_i} \quad (4.2)$$

Sendo:

$P$ : produtividade enzimática (U/d)

$AH_{t_f}$ : atividade de hidrólise no tempo final (U/g)

$AH_{t_i}$ : atividade de hidrólise no tempo inicial (U/g)

$t_f$ : tempo final (d)

$t_i$ : tempo inicial (d)

## 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.2.1 Seleção do meio de cultivo

O fungo *Aspergillus niger* O-4 produziu lipases com atividade de hidrólise entre 11 U/g e 27 U/g (dependendo da metodologia aplicada para determinação da atividade enzimática) quando foi utilizado o meio de cultivo com farelo de trigo e casca de arroz, enquanto que o uso de farelo e casca de soja proporcionou resultados inferiores a 2 U/g de atividade de hidrólise após 6 dias de fermentação. Colla et al. (2014) estudaram o efeito do pH e da temperatura durante o cultivo através de fermentação em estado sólido, sendo que eles obtiveram um modelo para a atividade enzimática das lipases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger* O-4 a partir desses parâmetros. Considerando o pH e a temperatura utilizados neste trabalho, a atividade enzimática deveria ser em torno de 31 U/g, sendo que o resultado obtido neste trabalho utilizando a mesma metodologia de Colla et al. (2014) levou a resultados próximos a 24 U/g.

A partir desses resultados o meio de cultivo selecionado para a produção de lipases na segunda etapa (seleção de microrganismos e indutores) foi o meio com farelo de trigo e casca de arroz.

#### 4.2.2 Padronização da metodologia para determinação da atividade de hidrólise

Em virtude do fungo *Aspergillus niger* O-4 ter apresentado atividade de hidrólise quando cultivado com o meio contendo farelo de trigo e casca de arroz, foram avaliados os resultados relativos a este meio para a padronização da metodologia de determinação da atividade de hidrólise. Os resultados de atividade enzimática são apresentados na Tabela 4.4 e os resultados da análise de variância são mostrados na Tabela 4.5.

Tabela 4.4 – Resultados de atividade de hidrólise das lipases no estudo da padronização da metodologia utilizando o meio de cultura contendo farelo de trigo e casca de arroz

Experimento	Emulsão	Concentração da solução tampão	AH (U/g)*
1	A	0,1 mol/L	26,04 ± 1,32 <sup>a</sup>
2	B	0,1 mol/L	12,09 ± 1,32 <sup>b</sup>
3	A	0,01 mol/L	24,18 ± 0,00 <sup>a</sup>
4	B	0,01 mol/L	11,63 ± 0,66 <sup>b</sup>

AH: atividade de hidrólise

Emulsão A: 25 % de azeite de oliva e 75 % de solução de goma arábica 7 %

Emulsão B: 50 % de azeite de oliva e 50 % de solução de goma arábica 7 %

\*Resultados de média ± desvio-padrão. Médias seguidas de letras diferentes na coluna apresentam diferença significativa entre si através do teste de Tukey com um nível de significância de 5%.

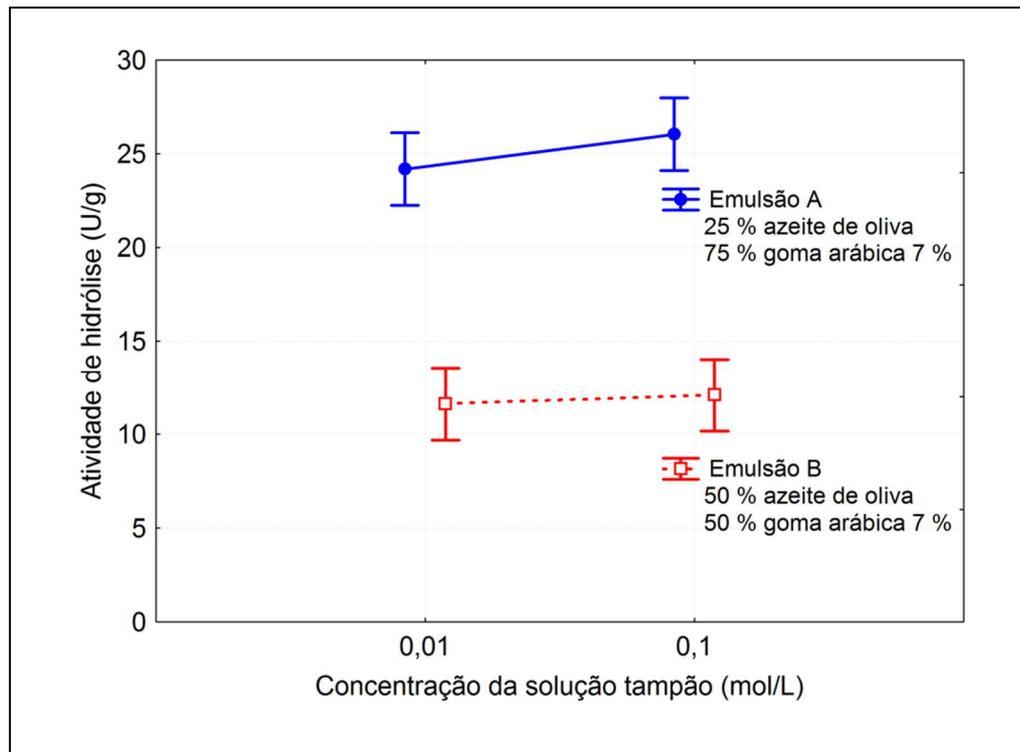
Tabela 4.5 – Análise de variância dos resultados de atividade de hidrólise para os experimentos do planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> utilizado para a padronização da metodologia

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F	p
Emulsão (X <sub>1</sub> )	351,26	1	351,26	361,00	< 0,0001
Concentração (X <sub>2</sub> )	2,70	1	2,70	2,78	0,1709
Interação X <sub>1</sub> * X <sub>2</sub>	0,97	1	0,97	1,00	0,3739
Erro	3,89	4	0,97		

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; F: Fisher; p: probabilidade.

A concentração da solução tampão não influenciou no resultado de atividade de hidrólise, enquanto que a emulsão utilizada na análise apresentou influência significativa ( $p < 0,0001$ ), sendo os efeitos apresentados na Figura 4.1.

Figura 4.1 – Efeito da emulsão e da concentração de solução tampão sobre a atividade de hidrólise das lipases do fungo *Aspergillus niger* O-4



Fonte: elaborada pelo autor.

Deve-se salientar que a emulsão preparada com uma proporção de 1:1 de azeite de oliva e solução de goma arábica apresentou baixa estabilidade durante a análise, havendo a ruptura da emulsão durante a incubação. Este fenômeno impede a ação da enzima sobre o substrato, o que justifica o resultado menor de atividade quando utilizada essa emulsão. A proporção de 1:3 proporcionou uma maior estabilidade na emulsão, permitindo uma homogeneização constante durante a incubação e titulação. O fato da concentração da solução tampão não ter influenciado na análise se deve ao fato da pequena quantidade de fosfato de sódio presente em relação à quantidade de hidróxido de sódio utilizada nas titulações. Além disso, sua influência é minimizada em virtude do método considerar no cálculo a titulação de uma amostra controle, com a enzima inativada.

A partir desses resultados estabeleceu-se como padrão o método baseado em Burkert, Maugeri e Rodrigues (2004), que indica o uso de solução tampão de fosfato de sódio com

concentração de 0,01 mol/L e uma emulsão com proporção de 1:3 (v/v) de azeite de oliva e solução de goma arábica 7 %.

#### 4.2.3 Seleção de microrganismos e indutores

A Tabela 4.6 apresenta os resultados de atividade de hidrólise após os 6 dias de fermentação, segundo os experimentos do Planejamento Fatorial Completo 3<sup>2</sup>.

Tabela 4.6 – Resultados de atividade de hidrólise das lipases produzidas nas condições do planejamento fatorial completo 3<sup>2</sup> utilizado para a seleção de fungos e indutores por fermentação em estado sólido

Experimento	Microrganismo	Indutor	AH (U/g)*
1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	OS (2 %)	7,69 ± 0,12
2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	G (1 %)	3,97 ± 0,24
3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	OS (2 %) e G (1 %)	0,00 ± 0,00
4	<i>Aspergillus niger</i>	OS (2 %)	1,03 ± 0,27
5	<i>Aspergillus niger</i>	G (1 %)	0,00 ± 0,00
6	<i>Aspergillus niger</i>	OS (2 %) e G (1 %)	1,64 ± 0,02
7	<i>Aspergillus niger</i> O-4	OS (2 %)	24,17 ± 6,23
8	<i>Aspergillus niger</i> O-4	G (1 %)	5,87 ± 1,52
9	<i>Aspergillus niger</i> O-4	OS (2 %) e G (1 %)	7,75 ± 5,69

AH: atividade de hidrólise; OS: óleo de soja; G: glicerol

\*Resultados apresentados como média ± desvio padrão

As maiores atividades de hidrólise foram obtidas utilizando-se o fungo *Aspergillus niger* O-4, de 24,17 U/g em 6 dias de fermentação. Em relação ao indutor, observou-se que as maiores atividades de hidrólise foram encontradas utilizando-se 2 % de óleo de soja, com valores de atividade de 7,69 U/g, 1,03 U/g e 24,17 U/g, para os fungos *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus niger* O-4, respectivamente.

Os lipídios são indutores essenciais para produção de lipases (MESSIAS et al., 2011) e o óleo de soja, assim como outros óleos vegetais, pode ser considerado uma fonte de carbono comumente utilizadas para esse processo (DAMASO et al., 2008). Porém, devido ao alto custo desses óleos, e sua importância como alimento, torna-se importante o estudo de fontes alternativas como o glicerol (COSTA et al., 2011).

Oliveira et al. (2013) compararam os processos de fermentação submersa e em estado sólido para produção de lipases com *Fusarium sp.* testando como fontes de carbono os óleos de soja, dendê, linhaça, milho, oliva, crambe e frango. Os autores obtiveram até 87 % de redução de custos de produção quando utilizaram o processo de fermentação em estado sólido, sendo que a maior atividade de hidrólise obtida, de 5 U/mL, foi semelhante à relatada neste trabalho.

O óleo de soja possui ácidos graxos insaturados, como o linoleico (50 %) e linolênico (7 %), além de oleico (24 %). Como as lipases atuam sobre os ácidos graxos, a adição de óleo de soja no meio de cultivo do fungo induz a produção de enzimas que tenham maior afinidade com ácidos graxos insaturados e de cadeia longa (PASTORE; COSTA; KOBLITZ, 2003).

Embora o glicerol seja assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas para a obtenção de energia metabólica (RIVALDI et al., 2010), em substratos fermentescíveis contendo glicose e utilizando glicerol como principal fonte de carbono, pode haver repressão durante o crescimento celular, o que justificaria a menor produção de lipases com esse indutor (BARBOSA, 2009).

Os resultados do planejamento experimental mostraram que o fungo *Aspergillus niger* O-4 com adição de 2 % óleo de soja apresentou a melhor condição de produção de lipase com atividade hidrolítica. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Rigo et al. (2012), que na produção de lipases por fermentação em estado sólido com o fungo *Penicillium crustosum*, com suplementação do meio de cultivo com ureia e óleo de soja foi obtida a maior atividade hidrolítica de 147 U/g em 72 h.

Os efeitos estimados através da análise de variância, os quais são apresentados na Tabela 4.7 e que foram determinados a partir dos resultados de produtividade enzimática, indicaram que o fator de interação entre o microrganismo na forma linear e o indutor na forma quadrática, assim como o fator de interação entre o microrganismo na forma quadrática e o indutor na forma linear mostraram influência significativa ( $p < 0,05$ ).

O fungo apresentou efeito linear positivo e efeito quadrático negativo, ambos significativos ( $p < 0,05$ ), corroborando as conclusões anteriores de que os resultados de maior atividade de hidrólise foram obtidos nos níveis superiores desta variável, ou seja, utilizando o fungo *Aspergillus niger* O-4. Observa-se na Figura 4.2, que mostra os resultados de produtividade para cada experimento realizado, a existência de menores valores no ponto central do planejamento, utilizando o fungo *A. niger*.

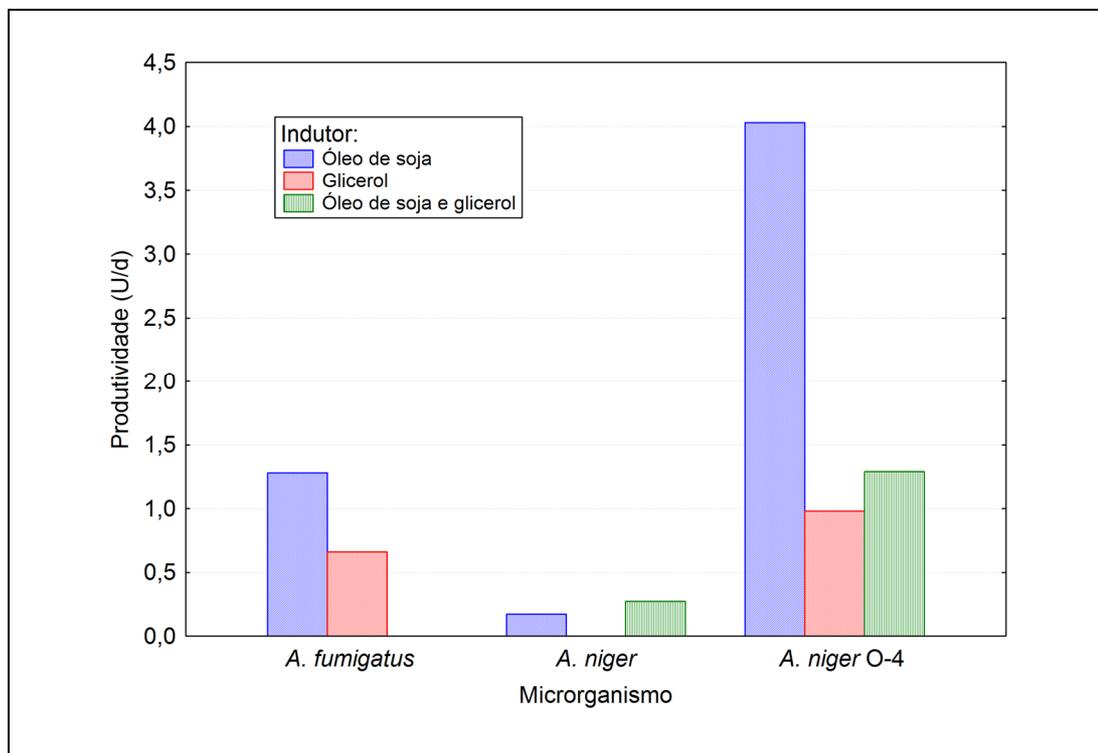
Em relação à variável indutor, o efeito linear foi significativo e negativo, indicando que maiores produtividades foram obtidas no nível inferior desta variável, ou seja, com a utilização de óleo de soja.

Tabela 4.7 – Efeitos estimados a partir da análise de variância da produtividade enzimática em função do microrganismo e do indutor para a fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais

Fonte de variação	Efeito estimado	p
Microrganismo ( $X_1$ ) (L)	1,452	0,0005
Microrganismo ( $X_1$ ) (Q)	-1,225	0,0006
Indutor ( $X_2$ ) (L)	-1,305	0,0011
Indutor ( $X_2$ ) (Q)	-0,628	0,0272
Interação $X_1$ (L) * $X_2$ (L)	-0,727	0,0593
Interação $X_1$ (L) * $X_2$ (Q)	-0,851	0,0172
Interação $X_1$ (Q) * $X_2$ (L)	1,056	0,0056
Interação $X_1$ (Q) * $X_2$ (Q)	0,304	0,2604

p: probabilidade; L: efeito linear; Q: efeito quadrático.

Figura 4.2 – Produtividade enzimática dos fungos estudados em função do tipo de indutor utilizado



Fonte: elaborada pelo autor.

Os fungos filamentosos são reconhecidos como sendo as melhores fontes de lipases. As espécies que apresentam maior potencial de produção de lipases pertencem aos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor*. O fungo selecionado nesta fermentação pertence ao gênero *Aspergillus*, sendo um promissor fungo para obtenção de lipases (CARDENAS et al., 2001).

A partir desses resultados optou-se por prosseguir o estudo utilizando os níveis que apresentaram os valores mais elevados para a produtividade enzimática, sendo então realizado um planejamento experimental do tipo fatorial completo  $2^2$  com 3 pontos centrais para estudar o efeito da umidade e da concentração de óleo de soja (indutor selecionado) sobre a produção de lipases pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* O-4 (microrganismo selecionado).

#### 4.2.4 Efeito da umidade e da concentração de indutor

A Tabela 4.8 apresenta os resultados de atividade de hidrólise após seis dias de fermentação para os ensaios previstos no planejamento fatorial completo  $2^2$  com 3 pontos centrais. As maiores atividades de hidrólise, 11,71 U/g a 13,44 U/g, foram obtidas na condição de 2 % de óleo de soja e 65 % de umidade, em 6 dias de fermentação.

Tabela 4.8 – Resultados de atividade de hidrólise das lipases produzidas nas condições do planejamento fatorial completo  $2^2$  com 3 pontos centrais utilizado na avaliação do efeito da umidade e da concentração do óleo de soja com o fungo *Aspergillus niger* O-4

Experimento	Umidade (%)	Concentração de indutor (%)	AH (U/g)*
1	60	0	10,82 ± 0,31
2	70	0	7,77 ± 0,11
3	60	4	4,84 ± 0,59
4	70	4	0,00 ± 0,00
5	65	2	13,44 ± 1,28
6	65	2	11,71 ± 0,46
7	65	2	12,32 ± 0,74

AH: atividade de hidrólise

\*Resultados apresentados como média ± desvio padrão

No tempo inicial da fermentação obtiveram-se valores diferentes de zero para as atividades de hidrólise, o que pode ser explicado pelo fato do farelo puro apresentar uma certa atividade enzimática por grama de substrato seco (RIGO et al., 2012).

A adição de óleo de soja na concentração de 4 % em comparação aos ensaios não adicionados do indutor não ocasionou aumento na atividade hidrolítica. Alguns autores demonstraram que a suplementação muitas vezes não leva ao aumento da produção de lipases, devido ao efeito de inibição por excesso de substrato. A suplementação de torta de soja com óleo de soja para a produção de lipases por fermentação em estado sólido, com o uso do fungo *Penicillium simplicicimum*, pesquisado por Di Luccio et al. (2004) não causou aumento da produção de lipase. Esse fato foi comprovado visto que nos ensaios adicionados de 2 % de óleo de soja, as atividades de hidrólise foram superiores às aquelas obtidas com 0 % e 4 % do indutor.

A análise de variância (Tabela 4.9) dos resultados de produtividade mostrou que houve influência significativa ( $p < 0,05$ ) de ambos os fatores de estudo (umidade e concentração de indutor) na resposta.

Tabela 4.9 – Análise de variância dos resultados de produtividade para os experimentos do planejamento fatorial completo  $2^2$

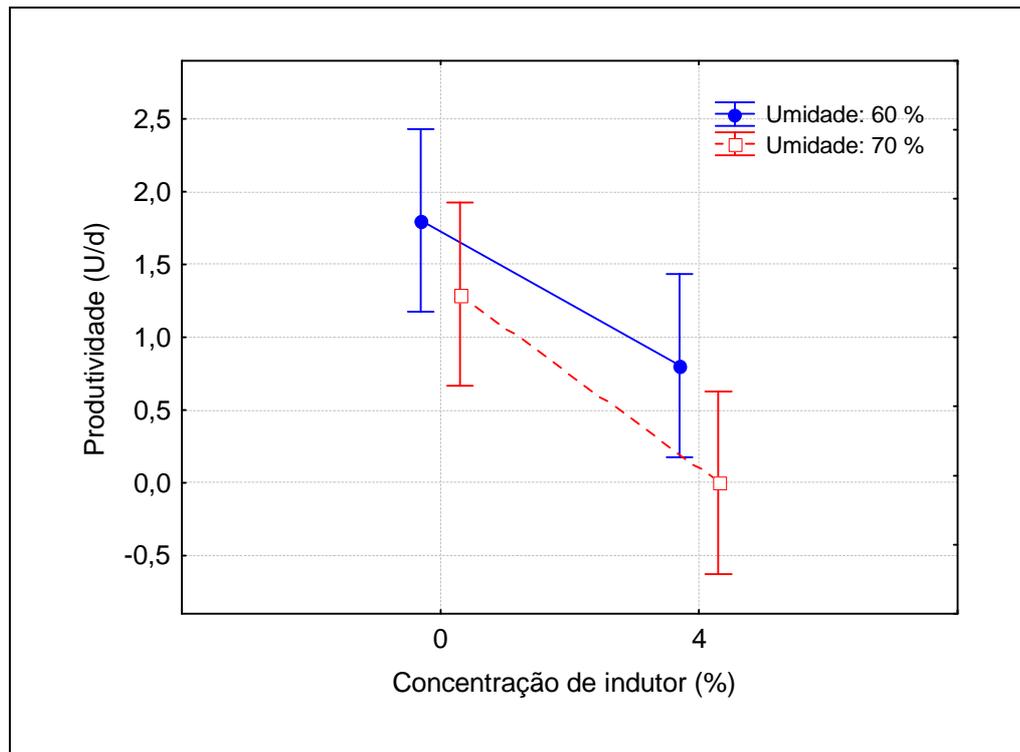
Fonte de variação	SQ	GL	QM	F	p
Umidade ( $X_1$ )	0,4323	1	0,4323	20,20	0,0461
Concentração de indutor ( $X_2$ )	1,3129	1	1,3129	61,35	0,0159
Interação ( $X_1 * X_2$ )	0,0223	1	0,0223	1,04	0,4150
Curvatura	2,0948	1	2,0948	97,89	0,0101
Erro	0,0427	2	0,0214		

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; F: Fisher; p: probabilidade.

Verifica-se na Tabela 4.9 que a curvatura foi significativa ( $p < 0,05$ ), indicando a presença de um ponto de máximo nas atividades de hidrólise após 6 dias de fermentação, próximo aos pontos centrais do planejamento experimental. Conforme pode ser observado na Figura 4.3, que mostra o efeito de interação da umidade e da concentração de indutor sobre a produtividade enzimática, a análise dos efeitos indicou que a umidade apresentou efeito significativo negativo, com maiores atividades sendo obtidas em 60 % de umidade. O aumento da umidade pode ocasionar a compactação e saturação do meio, diminuindo a oxigenação e, portanto, o crescimento fúngico e a produção de lipases (PANDEY, 2003). A

quantidade de água é considerada ótima no ponto de saturação do substrato e dependendo do tipo de substrato, pode variar entre 30 % e 85 % (BELLON-MAUREL; ORLIAC; CHRISTEN, 2003), justificando as quantidades de umidade escolhidas no planejamento.

Figura 4.3 – Efeito da umidade e da concentração de indutor sobre a produtividade das lipases do fungo *Aspergillus niger* O-4 durante a fermentação em estado sólido



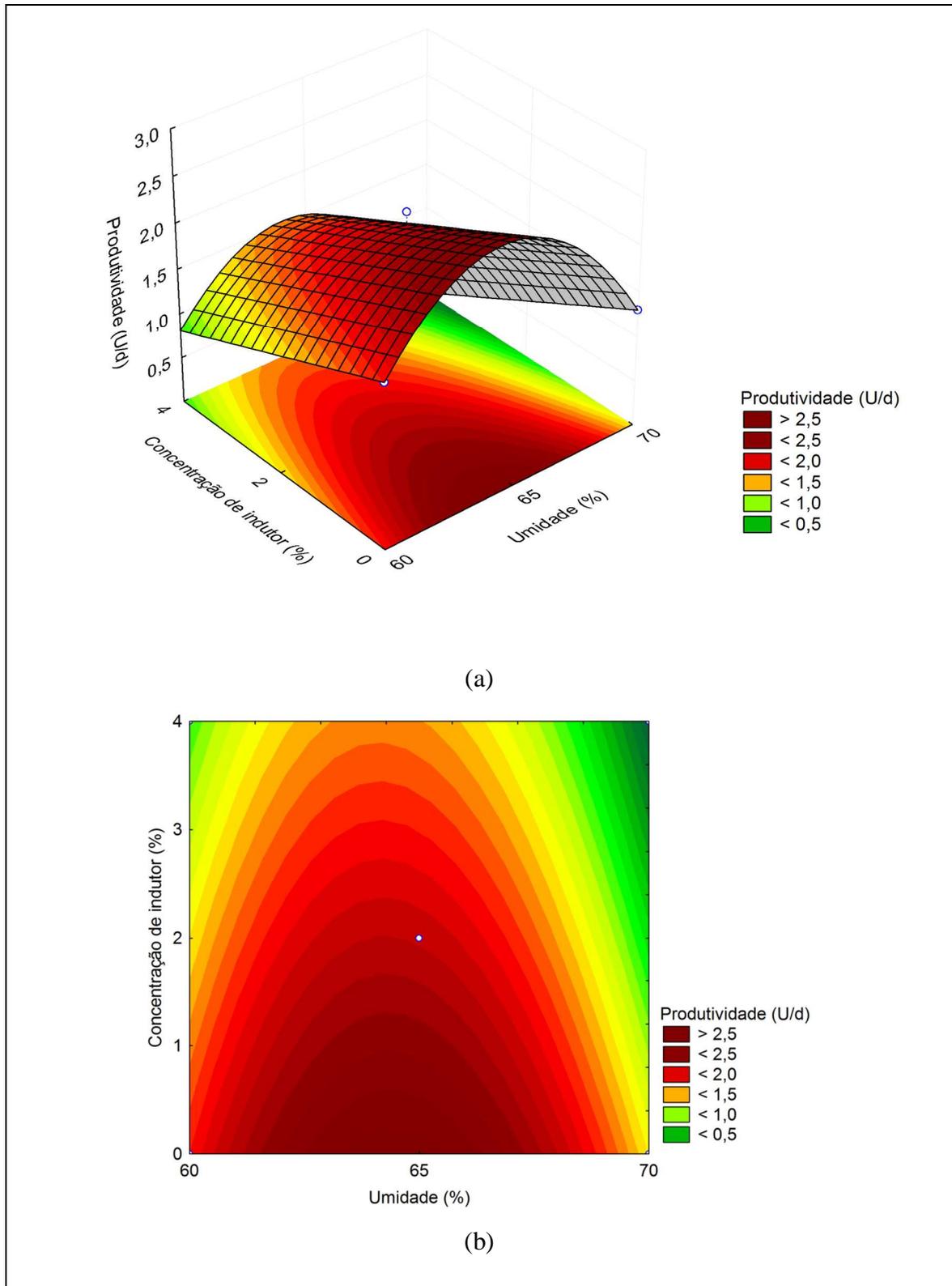
Fonte: elaborada pelo autor.

Entretanto, deve ser salientado que a maior produtividade foi obtida no ponto central (comprovado pelo efeito significativo da curvatura), sendo esse efeito melhor visualizado na Figura 4.4, que mostra a superfície de resposta para a produtividade em função da umidade e da concentração de indutor.

A superfície de resposta mostrou que a umidade ideal estaria nos níveis centrais (65 % de umidade), indicando que se pode usar umidade entre 60 % e 65 %, pois as atividades obtidas são muito semelhantes.

Segundo Fernandes (2007), que avaliou a produção de lipases por fermentação em estado sólido com umidades de 35 %, 45 %, 55 % e 65 %, os melhores resultados foram obtidos com 55 % de umidade, seguido da fermentação realizada com 65 % de umidade. Nos cultivos com 35 % de umidade não foi observada atividade de hidrólise.

Figura 4.4 – Produtividade das lipases do fungo *Aspergillus niger* O-4 em função da umidade e da concentração de indutor durante a fermentação em estado sólido: (a) superfície de resposta da produtividade; (b) curvas de contorno da produtividade



Fonte: elaborada pelo autor.

A concentração do indutor apresentou efeito negativo significativo na análise dos efeitos após os seis dias de fermentação, indicando que as maiores atividades foram obtidas sem adição do indutor ou na condição de adição de 2 % do indutor, corroborando os resultados anteriormente apresentados.

### **4.3 CONCLUSÕES DESTA ETAPA**

O meio de cultura que apresentou melhores resultados de produção de lipases com atividade de hidrólise através de fungos filamentosos em fermentação em estado sólido continha 85 % de farelo de trigo e 15 % de casca de arroz.

A padronização da metodologia de determinação da atividade de hidrólise mostrou que o uso de uma emulsão de azeite de oliva e solução de goma arábica deve seguir a proporção de 1:3, sendo que a concentração da solução tampão no processo não influenciou nos resultados.

Na seleção de fungos filamentosos produtores de lipases, as maiores atividades de hidrólise foram obtidas com o fungo *Aspergillus niger* O-4 e com o óleo de soja como indutor. Para o estudo das variáveis umidade e concentração de indutor, ambas apresentaram influência significativa sobre a produção de enzima, sendo que as maiores atividades de hidrólise foram encontradas nos pontos centrais (65 % de umidade e 2 % de óleo de soja) para 6 dias de fermentação.

## **5 SEPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE LIPASES DE *Aspergillus niger* UTILIZANDO MEMBRANAS**

Na terceira etapa do trabalho os objetivos foram: produzir lipases em bandejas por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais com o fungo filamentoso *Aspergillus niger* O-4 (o qual apresentou os resultados mais promissores para a produção de lipases com atividade de hidrólise e de esterificação), concentrar as lipases produzidas utilizando módulos de separação com membranas de microfiltração e de ultrafiltração, e caracterizar os processos sequenciais de separação.

### **5.1 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **5.1.1 Microrganismo**

O fungo utilizado nesta parte do trabalho foi *Aspergillus niger* O-4, previamente isolado por Colla et al. (2009) de solo contaminado com óleo diesel e selecionado nas partes anteriores deste trabalho como adequado produtor de lipases através de fermentação em estado sólido.

O fungo foi submetido à identificação genética no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Cena) da Universidade de São Paulo, utilizando a metodologia citada por Smaniotto et al. (2012). As sequências de bases nitrogenadas do fungo foram comparadas aos dados (18S rRNA) obtidos no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O fungo foi identificado como *Aspergillus niger* cepa DAOM (100% de identidade, código de acesso no *GenBank*: KC545858.1) (REINEHR et al., 2014).

#### **5.1.2 Produção de lipases através de fermentação em estado sólido**

##### *5.1.2.1 Manutenção e preparo do inóculo*

O fungo isolado foi mantido a 4 °C em tubos de ensaio com ágar-batata-dextrose (ABD), com repicagens periódicas a cada três meses. Para o preparo do inóculo foram adicionados 10 mL de solução de Tween 80 (0,1 %) aos tubos de ensaio com ágar, realizando-se a raspagem dos esporos com alça de platina. O inóculo foi preparado adicionando-se 2,5

mL da suspensão de esporos obtida em erlenmeyers de 1 L contendo 100 mL de ABD, com posterior incubação a 30 °C durante 7 dias. Após o crescimento fúngico na superfície do ágar adicionaram-se 50 mL de Tween 80 (0,1 %), seguido de uma raspagem dos esporos e filtração em gaze estéril para retenção das hifas, seguindo metodologia descrita por Colla (2009).

#### 5.1.2.2 Produção das enzimas

O processo de fermentação em estado sólido para a produção de lipases foi realizado em bandejas de polipropileno com dimensões de 30 cm x 35 cm, com quantidade inicial de meio seco de 250 g.

O meio de cultivo utilizado foi composto de 85 % de farelo de trigo e 15 % de casca de arroz, conforme resultados obtidos na etapa anterior. O farelo foi utilizado como suporte e fonte de nutrientes e a casca foi utilizada para aumentar a porosidade do meio e facilitar a transferência de oxigênio. Os meios de cultivo foram autoclavados a 121 °C por 20 min. A umidade foi ajustada a 65 % pela adição de água destilada estéril, sendo também adicionados 2 % de óleo de soja como indutor e solução salina com micronutrientes, de acordo com Colla (2009). Após o preparo do meio foi realizada a inoculação do fungo *Aspergillus niger* O-4 com a adição de solução de esporos para cada béquer, correspondendo a uma concentração final de esporos de  $10^7$  esporos/g de substrato.

As bandejas foram tampadas com manta acrílica hidrofóbica e incubadas em estufa a 30 °C por 6 dias (144 h), conforme Colla (2009), sendo então efetuada a extração das enzimas para a realização dos processos de separação com membranas.

#### 5.1.2.3 Extração das enzimas

As enzimas foram extraídas seguindo a metodologia de Colla (2009), utilizando a proporção de 1 g de farelo fermentado e 10 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L (pH 7,0). Os frascos foram submetidos à agitação a 160 rpm por 30 min a 37 °C e logo após filtrou-se em algodão para a remoção de sólidos suspensos, obtendo-se os extratos enzimáticos brutos.

Os extratos enzimáticos foram armazenados sob congelamento (-18 °C) até a realização dos ensaios de microfiltração e ultrafiltração posteriores.

### 5.1.3 Sistema de filtração com membranas

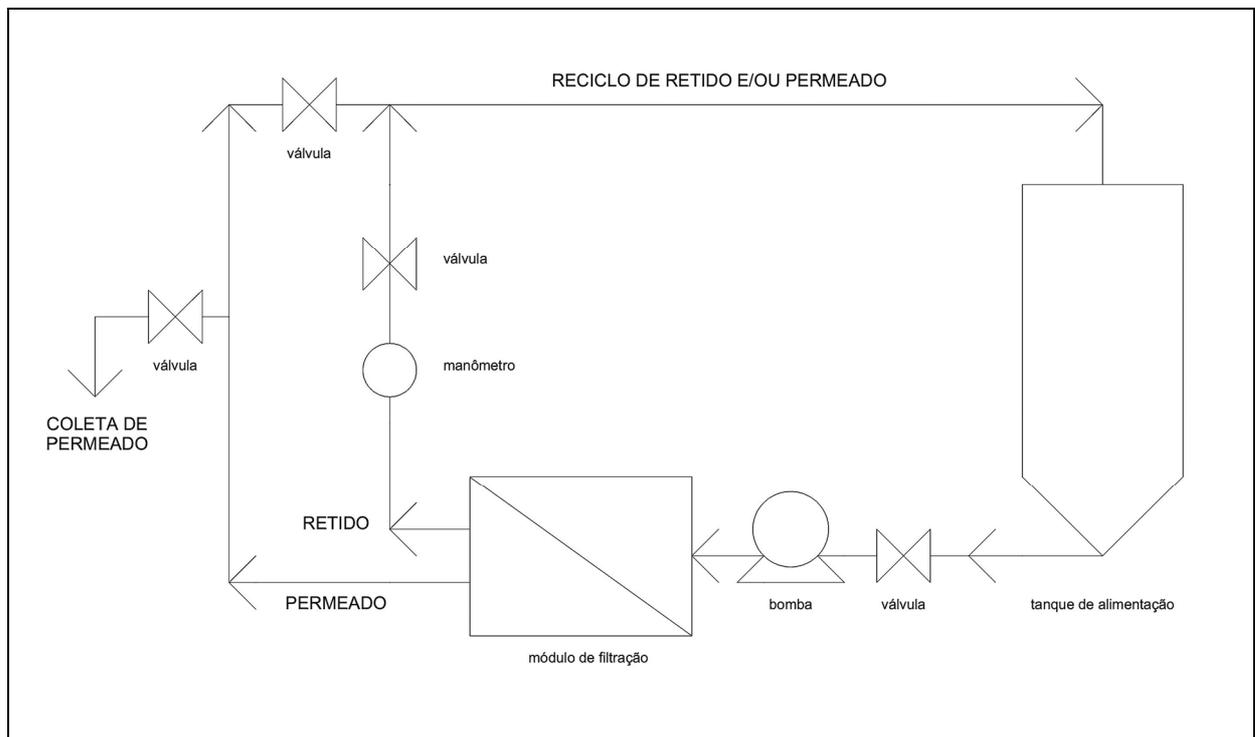
Os ensaios de concentração das enzimas foram realizados em um módulo de membranas com configuração plana, confeccionado em acrílico conforme descrição a seguir.

#### 5.1.3.1 Especificação do sistema

O sistema foi constituído de um tanque de PVC para a alimentação, uma válvula de esfera para controle da alimentação, um módulo de membrana com 14,5 cm de comprimento, 8,5 cm de largura e 8,7 cm de altura, uma bomba peristáltica (Masterflex<sup>®</sup>, modelo 77200-52), uma válvula de esfera para controle da pressão, um tê com manômetro e mangueiras interconectoras. A pressão máxima de operação do sistema era de 300 kPa.

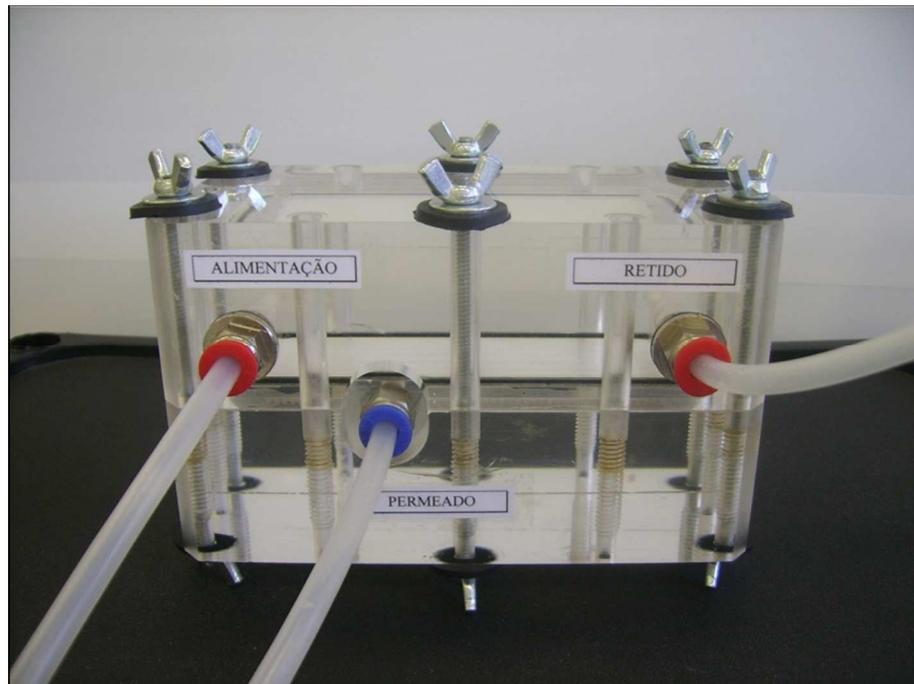
As Figuras 5.1 e 5.2 apresentam, respectivamente, o diagrama esquemático do aparato experimental e uma fotografia do módulo de filtração utilizado nos ensaios. O módulo foi projetado para uso com membranas planas de 12,5 cm de comprimento por 6,0 cm de largura, apresentando uma área útil de filtração de 0,006 m<sup>2</sup> (60 cm<sup>2</sup>).

Figura 5.1 – Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado na concentração de lipases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger* O-4



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 5.2 – Vista do módulo de bancada utilizado no processo de separação por membranas



Fonte: elaborada pelo autor.

A vazão de alimentação foi controlada através da válvula de esfera e do seletor de potência da bomba peristáltica. Previamente à realização dos experimentos procedeu-se o ajuste do seletor da bomba para que o mesmo indicasse a vazão. Para esse ajuste foi instalado um rotâmetro antes do filtro, sendo realizada a verificação da vazão em função da potência apresentada no seletor, de forma a possibilitar a realização dos experimentos mantendo a vazão de alimentação no valor estabelecido. A pressão foi verificada através do manômetro localizado na linha de retido, sendo o controle desse parâmetro realizado pela válvula de esfera. As filtrações foram realizadas em temperatura ambiente (25 °C).

### 5.1.3.2 Especificação das membranas

Foram utilizadas cinco membranas planas distintas, sendo duas de microfiltração e três de ultrafiltração, conforme descrição a seguir.

As duas membranas de microfiltração eram hidrofílicas e constituídas de acetato de celulose. O diâmetro dos poros era de 20  $\mu\text{m}$  na primeira membrana (Whatman<sup>®</sup>, Grau 4) e de 0,45  $\mu\text{m}$  na segunda (Millipore<sup>®</sup>, modelo HAWP04700).

As três membranas de ultrafiltração eram hidrofílicas e constituídas de polietersulfona (PES). A primeira (Omega<sup>®</sup>, modelo OM100150) apresentava massa molar de corte de 100

kDa, a segunda (Omega<sup>®</sup>, modelo OM050150) possuía massa molar de corte de 50 kDa, enquanto que a terceira (GE Osmonics<sup>®</sup>, modelo YMPWSP3001) apresentava massa molar de corte de 20 kDa.

#### **5.1.4 Separação e concentração das lipases produzidas por fermentação em estado sólido**

##### *5.1.4.1 Microfiltração do extrato enzimático*

O extrato enzimático foi inicialmente submetido a uma microfiltração com a membrana de 20 µm para a retirada de material particulado em suspensão. Com o permeado dessa filtração procedeu-se uma segunda microfiltração, desta vez com a membrana de 0,45 µm, a fim de separar partículas maiores que 0,1 µm provenientes da fermentação.

O sistema de filtração foi operado a 25 °C com uma alimentação de 2 L, vazão fixa de 2 L/min e pressão transmembrana de 20 kPa (primeira microfiltração) e 98 kPa (segunda microfiltração), sendo que as membranas foram imersas por 24 h em água deionizada a temperatura ambiente antes de sua utilização. Após cada microfiltração foram efetuadas análises de proteínas, atividade de hidrólise e atividade de esterificação nos permeados e nos retidos. O permeado da segunda microfiltração foi armazenado sob refrigeração (4 °C) para subsequente realização da ultrafiltração.

##### *5.1.4.2 Ultrafiltração do extrato enzimático*

Após as duas microfiltrações foram efetuados mais três processos sequenciais de separação, utilizando três membranas de ultrafiltração (com massas molares de corte de 100 kDa, 50 kDa e 20 kDa), de forma a fracionar o extrato enzimático. O permeado de cada filtração foi utilizado como alimentação do processo subsequente.

O sistema foi operado a 25 °C com uma alimentação de 1 L, vazão fixa de 1 L/min e pressão transmembrana de 98 kPa (primeira e segunda ultrafiltração) e 196 kPa (terceira ultrafiltração), sendo que as membranas foram imersas por 24 h em etanol e por mais 24 h em água deionizada a temperatura ambiente para o condicionamento prévio à sua utilização (SHUKLA; CHERYAN, 2002). Após cada ultrafiltração foram efetuadas análises de proteínas, atividade de hidrólise e atividade de esterificação nos permeados e nos retidos.

### 5.1.5 Determinações analíticas

#### 5.1.5.1 Quantificação de proteína

Foi realizada a quantificação de proteínas no extrato enzimático inicial antes da microfiltração e após cada microfiltração, assim como no permeado e no retido de cada ultrafiltração.

A determinação de nitrogênio total foi realizada pelo método de Kjeldahl, sendo convertido em concentração de proteína empregando-se o fator de conversão 6,25 conforme Silveira e Furlong (2007).

#### 5.1.5.2 Atividade de hidrólise

A atividade de hidrólise dos extratos enzimáticos da alimentação, do permeado e do retido dos processos de filtração foi determinada, em triplicata, através do método proposto por Burkert, Maugeri e Rodrigues (2004), o qual se baseia na titulação com hidróxido de sódio dos ácidos graxos livres liberados pela ação da lipase presente no extrato enzimático sobre os triacilgliceróis do azeite de oliva emulsionados em goma arábica.

Em frascos de 250 mL foram adicionados 2 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7,0) (0,01 mol/L), 5 mL de emulsão de azeite de oliva e goma arábica a 7 % (proporção de 1:3). A este sistema foi adicionado 1 mL de extrato enzimático e colocado a 37 °C durante 30 min. Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de 15 mL de solução de acetona e etanol (1:1) com posterior titulação dos ácidos graxos liberados com uma solução de hidróxido de sódio 0,01 mol/L até atingir pH 11.

Uma unidade de atividade de hidrólise foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto por mililitro de amostra (1 U/mL = 1 μmol/min/mL), nas condições do ensaio, conforme a Equação 5.1.

$$AH = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 1000}{t \times V} \quad (5.1)$$

Sendo:

*AH*: atividade de hidrólise (U/mL)

*V<sub>a</sub>*: volume de NaOH titulado com a amostra (mL)

$V_b$ : volume de NaOH titulado com o branco (mL)

$M$ : concentração molar da solução de NaOH (mol/L)

$t$ : tempo de reação (min)

$V$ : volume de amostra (mL)

### 5.1.5.3 Atividade de esterificação

A atividade de esterificação dos extratos enzimáticos da alimentação, do permeado e do retido dos processos de filtração foi determinada, em triplicata, através do método proposto por Silva et al. (2011). A atividade de esterificação foi quantificada através da reação entre ácido graxo e etanol na razão molar de 1:1 (mistura padrão). A reação foi conduzida em erlenmeyers contendo 5 mL da mistura padrão e 0,1 mL da amostra, após foram incubados em banho a 40 °C por 40 min e agitação de 160 rpm. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata e adicionadas a 20 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para paralisar a reação e para extração do ácido graxo. Após, a quantidade de ácido graxo consumido foi determinada através da titulação com NaOH 0,035 mol/L até atingir o pH 11,0. Os ensaios controles continham 20 mL da solução de acetona-etanol (1:1) e 500 µL da mistura padrão.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido graxo por minuto por mililitro de amostra (1 U/mL = 1 µmol/min/mL), nas condições do ensaio, e calculada utilizando a Equação 5.2.

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \times M \times V_f \times 1000}{t \times V \times V_c} \quad (5.2)$$

Sendo:

$AE$ : atividade de esterificação (U/mL)

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

$V_b$ : volume de NaOH gasto na titulação da amostra do ensaio controle (mL)

$M$ : concentração molar da solução de NaOH (mol/L)

$V_f$ : volume final de meio reacional (mL)

$t$ : tempo de reação (min)

$V$ : volume de amostra contendo a enzima (mL)

$V_c$ : volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL)

#### 5.1.5.4 Atividade enzimática específica

As atividades específicas de hidrólise e de esterificação foram determinadas levando-se em conta a quantidade de proteína presente nas amostras, conforme apresentado na Equação 5.3.

$$A_{esp} = \frac{A}{C_p} \quad (5.3)$$

Sendo:

$A_{esp}$ : atividade específica de hidrólise ou de esterificação (U/mg)

$A$ : atividade de hidrólise ou de esterificação (U/mL)

$C_p$ : concentração de proteína na amostra ( $\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{mL}_{\text{amostra}}$ )

#### 5.1.5.5 Fator de concentração volumétrico

Durante a concentração do extrato enzimático o fator de concentração volumétrico (FCV) foi determinado como a razão entre o volume da alimentação no início de cada etapa de filtração e o volume de retido após o processo (Equação 5.4), conforme Krstic et al. (2007) e Rodríguez-Fernández et al. (2013).

$$FCV = \frac{V_{\text{alimentação}}}{V_{\text{retido}}} \quad (5.4)$$

Sendo:

$FCV$ : fator de concentração volumétrica

$V_{\text{alimentação}}$ : volume da alimentação no início de cada processo (mL)

$V_{\text{retido}}$ : volume de retido após cada processo (mL)

#### 5.1.5.6 Retenção das membranas

O parâmetro de retenção das membranas (para proteína, atividade de hidrólise e atividade de esterificação) foi calculado de acordo com a Equação 5.5, conforme Krstic et al.

(2007) e Rodríguez-Fernández et al. (2013). A determinação foi efetuada para cada etapa do processo de separação sequencial.

$$R = \left(1 - \frac{A_{\text{permeado}}}{A_{\text{retido}}}\right) \times 100 \quad (5.5)$$

Sendo:

$R$ : retenção (%)

$A_{\text{permeado}}$ : proteína (%) ou atividade de hidrólise ou esterificação (U/mL) no permeado

$A_{\text{retido}}$ : proteína (%) ou atividade de hidrólise ou de esterificação (U/mL) no retido

#### 5.1.5.7 Rendimento do processo

O rendimento de quantidade de proteínas e de atividade enzimática durante a concentração foi determinado pela razão da quantidade total de proteínas (ou atividade enzimática total) do retido em função da quantidade total de proteínas (ou atividade enzimática total) da alimentação (Equação 5.6), calculado para cada etapa de filtração conforme Krstic et al. (2007) e Rodríguez-Fernández et al. (2013).

$$Y = \frac{AT_{\text{retido}}}{AT_{\text{alimentação}}} \times 100 \quad (5.6)$$

Sendo:

$Y$ : rendimento (%)

$AT_{\text{retido}}$ : proteína (%) ou atividade total de hidrólise ou esterificação (U) no retido

$AT_{\text{alimentação}}$ : proteína (%) ou atividade total de hidrólise ou esterificação (U) da alimentação

#### 5.1.5.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese dos extratos enzimáticos provenientes dos processos de separação com membranas foi realizada utilizando-se um sistema de eletroforese vertical (Mini-Protean TGX, *Bio-Rad Laboratories*), conforme proposto por Laemmli (1970).

As amostras foram adicionadas a igual volume de tampão de amostra (glicerol 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 2,3%, Tris-HCl pH 6,8 0,0625 mol/L),

fervidas por três minutos, centrifugadas rapidamente e aplicadas no gel. O gel de 12 % de SDS-poliacrilamida com 1 mm de espessura foi confeccionado e submetido a uma corrente de 30 mA e a uma voltagem de 250 V por aproximadamente 1 h para as amostras percorrerem o gel. Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue por 1 h, sendo posteriormente colocado em solução de metanol e fotografado.

## 5.1.6 Caracterização dos processos sequenciais de filtração

### 5.1.6.1 Determinação da permeabilidade hidráulica das membranas

Inicialmente o fluxo de água deionizada foi mensurado para as cinco membranas citadas. Foram coletadas amostras a cada 5 min durante o processo, sendo aumentada a pressão transmembrana a cada amostragem, com um incremento de cerca de 10 kPa. O fluxo permeado foi calculado dividindo-se a massa de permeado pelo tempo de coleta das amostras e pela área da membrana, enquanto que a permeabilidade hidráulica foi determinada a partir da Equação 5.7.

$$J = L_p \times \Delta P \quad (5.7)$$

Sendo:

$J$ : fluxo permeado (L/m<sup>2</sup>.h)

$L_p$ : permeabilidade hidráulica (L/m<sup>2</sup>.kPa.h)

$\Delta P$ : pressão transmembrana (kPa)

### 5.1.6.2 Avaliação dos fluxos permeados da microfiltração e da ultrafiltração

Para a avaliação das vazões de permeado o sistema foi operado nos primeiros 30 min (para as membranas de microfiltração) e nos primeiros 60 min (para as membranas de ultrafiltração) com reciclo completo do permeado e do retido, ou seja, a concentração da alimentação foi mantida constante durante o processo, sendo recolhidas amostras periodicamente para cálculo do fluxo.

### 5.1.6.3 Resistências dos processos

Para a avaliação das resistências de cada etapa do processo de filtração sequencial foi utilizado o modelo de resistências dispostas em série, apresentado na Equação 5.8, conforme Argüello et al. (2003), sendo a resistência total calculada de acordo com a Equação 5.9. A resistência da membrana foi determinada através da filtração com água, enquanto que a resistência da incrustação foi calculada a partir da filtração e posterior lavagem com água, e a resistência do depósito foi verificada por diferença das anteriores.

$$R_t = R_m + R_i + R_d \quad (5.8)$$

Sendo:

$R_t$ : resistência total ( $m^{-1}$ )

$R_m$ : resistência da membrana ( $m^{-1}$ )

$R_i$ : resistência da incrustação ( $m^{-1}$ )

$R_d$ : resistência do depósito ( $m^{-1}$ )

$$R_t = \frac{\Delta P}{\mu \times J} \quad (5.9)$$

Sendo:

$R_t$ : resistência total ( $m^{-1}$ )

$\Delta P$ : pressão transmembrana (kPa)

$\mu$ : viscosidade do permeado (kPa.s)

$J$ : fluxo permeado ( $L/m^2.h$ )

### 5.1.6.4 Microscopia eletrônica de varredura das membranas

As membranas utilizadas no processos de separação foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (VEGA 3LM, *Tescan Orsay Holding*), a fim de monitorar a morfologia e observar modificações na estrutura antes e após os processos.

Previamente às análises de microscopia, as membranas de ultrafiltração foram fraturadas em nitrogênio líquido. As membranas foram então depositadas em um disco de aço inox sobre uma fita dupla face de carbono, sendo submetidas a um revestimento com um

filme de ouro (300 Å) a 30 mA por 4 min utilizando um metalizador (Q150R-ES, *Quorum Technologies Ltd.*).

## 5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.2.1 Produção de lipases em bandejas com resíduos agroindustriais

Após os 6 dias (144 h) do processo de fermentação em estado sólido em bandejas utilizando o fungo *Aspergillus niger* O-4 foi avaliada a atividade enzimática do farelo fermentado. Os resultados mostraram uma atividade de hidrólise média no extrato de 20,24 U/mL e uma atividade de esterificação média no extrato de 535,50 U/mL, indicando novamente a capacidade do fungo citado de produzir lipases com atividade de hidrólise e de esterificação simultaneamente a partir de resíduos agroindustriais.

Sethi et al. (2013) produziram lipases com *Aspergillus terreus* utilizando resíduos agroindustriais. O uso de farelo de trigo por fermentação em estado sólido proporcionou a obtenção de lipases com atividade de hidrólise de 50 U/mL, sendo que foi obtida a otimização dos parâmetros de fermentação através da combinação de diferentes resíduos agroindustriais, proporcionando uma complementação dos nutrientes disponíveis para o fungo, assim como neste trabalho, que levou em consideração a preparação de um meio com farelo de trigo e casca de arroz, suplementado com uma solução de micronutrientes.

A utilização da fermentação em estado sólido com resíduos agroindustriais vem se tornando importante para a diminuição dos custos de produção de enzimas. Coradi et al. (2013) produziram lipases através de fermentação submersa e de fermentação em estado sólido usando o fungo *Trichoderma harzianum*. Os autores verificaram que a maior atividade de hidrólise no extrato foi obtida através da fermentação submersa, porém o custo da fonte de carbono, em virtude da quantidade necessária, foi dez vezes maior, compensando significativamente a produção de lipases através de fermentação em estado sólido.

Após a fermentação em estado sólido em bandejas e posterior verificação da atividade enzimática presente nas amostras foi efetuada a extração das lipases em todo farelo fermentado nas bandejas, produzindo um total de 10 L de extrato bruto, o qual foi armazenado sob congelamento até o momento de realização dos processos sequenciais de separação por membranas.

### 5.2.2 Separação e concentração das lipases utilizando membranas

A Tabela 5.1 apresenta os resultados relacionados ao grau de concentração em cada uma das etapas sequenciais de filtração. Foram utilizados inicialmente 2 L de extrato bruto para a realização da primeira microfiltração, 1,8 L para a segunda microfiltração, 750 mL para a primeira ultrafiltração, 600 mL para a segunda ultrafiltração e 450 mL para a terceira ultrafiltração.

Tabela 5.1 – Parâmetros dos processos de separação com membranas de microfiltração e ultrafiltração

Processo	Amostra	Volume (mL)	FCV
Extração	Inicial	2000	-
Microfiltração (20 $\mu\text{m}$ )	Retido	100	20
	Permeado	1900	
Microfiltração (0,45 $\mu\text{m}$ )	Retido	300	6
	Permeado	1500	
Ultrafiltração (100 kDa)	Retido	75	10
	Permeado	675	
Ultrafiltração (50 kDa)	Retido	120	5
	Permeado	480	
Ultrafiltração (20 kDa)	Retido	350	1,3
	Permeado	100	

FCV: fator de concentração volumétrica

Em virtude do tamanho do poro ser de 20  $\mu\text{m}$ , era esperado que a primeira microfiltração não apresentasse uma elevada resistência ao processo de filtração, o que foi confirmado pelo seu fator de concentração volumétrica (FCV = 20), sendo que o processo foi interrompido com cerca de 15 minutos. A segunda microfiltração (membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ ) foi interrompida com um FCV de 6 após verificada visualmente a deposição significativa de partículas na membrana, diminuindo o fluxo de permeado. O primeiro processo de ultrafiltração (membrana de 100 kDa) foi levada até a obtenção de um FCV de 10, pois as partículas maiores que bloqueariam rapidamente os poros da membrana haviam sido excluídas na filtração anterior. As duas últimas ultrafiltrações levaram a um FCV de 5 e 1,3

em função da velocidade de filtração, sendo que na última o uso de pressão transmembrana abaixo de 100 kPa levaria a um fluxo de permeado aquém do desejado.

A Tabela 5.2 apresenta os resultados de atividade de hidrólise das amostras em cada etapa do processo de filtração sequencial, assim como os teores de proteínas presentes. Pode-se observar que o teor de proteínas, assim como a atividade de hidrólise do extrato bruto inicial, do permeado e do retido da primeira microfiltração foram estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), o que pode ser explicado pela retenção de eventuais partículas maiores que 20  $\mu\text{m}$  presentes nesse processo, levando a uma concentração semelhante de partículas pequenas, como as proteínas, em ambas as correntes (retido e permeado). A partir do permeado da ultrafiltração com a membrana de 100 kDa o teor de proteínas foi significativamente menor, evidenciando que a maior retenção de proteínas ocorreu nesta etapa do processo.

Tabela 5.2 – Resultados de atividade de hidrólise das amostras em cada etapa do processo de separação sequencial por membranas

Processo	Amostra	Proteína (mg/mL)*	AH (U/mL)*	AH <sub>esp</sub> (U/mg)*	R <sub>AH</sub> (%)
Extração	Inicial	15,36 <sup>b</sup> ± 0,68	20,24 <sup>b</sup> ± 0,65	1,318 <sup>cd</sup> ± 0,042	-
Microfiltração (20 $\mu\text{m}$ )	Retido	14,26 <sup>b</sup> ± 1,36	19,78 <sup>b</sup> ± 1,95	1,387 <sup>bc</sup> ± 0,137	2,34
	Permeado	15,53 <sup>b</sup> ± 1,30	19,32 <sup>b</sup> ± 1,95	1,244 <sup>cd</sup> ± 0,126	
Microfiltração (0,45 $\mu\text{m}$ )	Retido	26,25 <sup>a</sup> ± 1,86	18,86 <sup>b</sup> ± 0,65	0,718 <sup>d</sup> ± 0,025	21,96
	Permeado	10,06 <sup>c</sup> ± 1,86	14,72 <sup>b</sup> ± 0,65	1,423 <sup>bc</sup> ± 0,065	
Ultrafiltração (100 kDa)	Retido	17,19 <sup>b</sup> ± 0,06	60,72 <sup>a</sup> ± 3,90	3,532 <sup>a</sup> ± 0,227	92,44
	Permeado	2,49 <sup>d</sup> ± 0,19	4,60 <sup>c</sup> ± 0,65	1,845 <sup>bc</sup> ± 0,261	
Ultrafiltração (50 kDa)	Retido	3,94 <sup>d</sup> ± 0,00	7,82 <sup>c</sup> ± 1,30	1,986 <sup>b</sup> ± 0,330	100,00
	Permeado	2,54 <sup>d</sup> ± 0,12	0,00 <sup>d</sup>	0,00 <sup>e</sup>	
Ultrafiltração (20 kDa)	Retido	2,45 <sup>d</sup> ± 0,25	0,00 <sup>d</sup>	0,00 <sup>e</sup>	-
	Permeado	1,84 <sup>d</sup> ± 0,12	0,00 <sup>d</sup>	0,00 <sup>e</sup>	

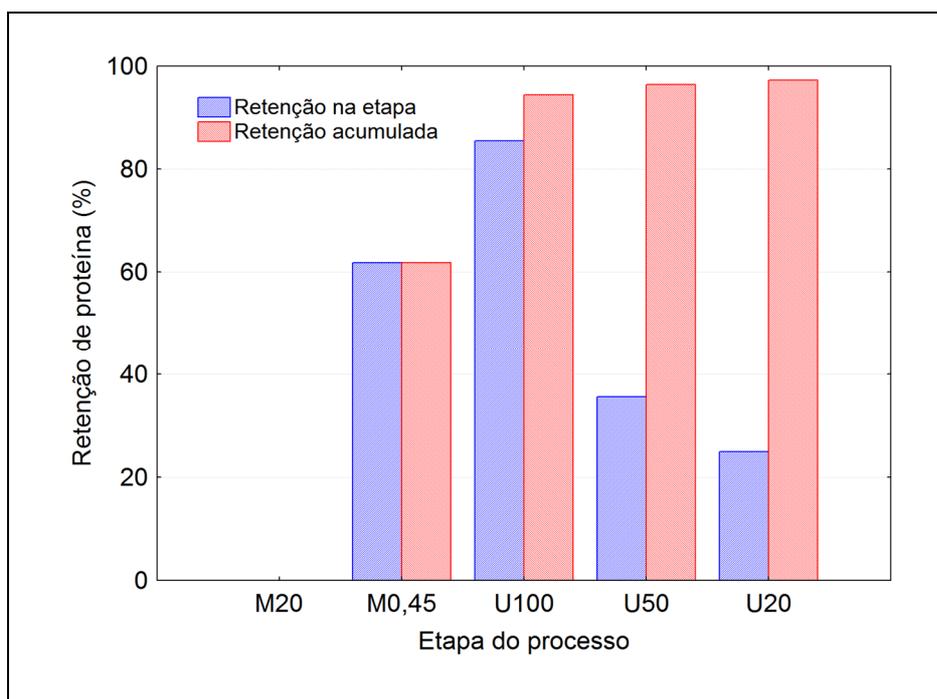
AH: atividade de hidrólise, AH<sub>esp</sub>: atividade específica de hidrólise, R<sub>AH</sub>: Retenção da atividade de hidrólise.

\*Resultados apresentados como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais na coluna não apresentam diferença significativa entre si com um nível de significância de 5%.

A retenção de proteína em cada etapa da filtração sequencial pode ser visualizada na Figura 5.3, a qual mostra que a segunda etapa (microfiltração de 0,45  $\mu\text{m}$ ) apresentou a maior retenção de partículas proteicas (superior a 60%), sendo que a combinação desta etapa com a

ultrafiltração subsequente (100 kDa) proporcionou uma retenção de proteínas superior a 90 %. A retenção de partículas proteicas não atingiu 100 % na ultrafiltração de 20 kDa, indicando que peptídios de baixo peso molecular foram coletados no permeado da última etapa.

Figura 5.3 – Retenção de proteína após os processos de microfiltração com membranas de 20  $\mu\text{m}$  (M20) e de 0,45  $\mu\text{m}$  (M0,45) e ultrafiltração com membranas de 100 kDa (U100), 50 kDa (U50) e 20 kDa (U20)



Fonte: elaborada pelo autor.

Em relação à atividade de hidrólise observa-se que o extrato bruto inicial apresentou resultados iguais ( $p > 0,05$ ) às amostras da primeira e da segunda microfiltração. O retido da ultrafiltração de 100 kDa apresentou resultados mais elevados tanto para a atividade de hidrólise quanto para a atividade específica, indicando que as lipases produzidas na fermentação em estado sólido foram retidas nessa membrana, concentrando as enzimas. Algumas lipases ainda permearam essa membrana, mas foram completamente retidas na membrana de 50 kDa. A partir do permeado dessa membrana os resultados de atividade de hidrólise foram nulos, mostrando que as enzimas foram retidas pelas membranas nos últimos processos.

Na segunda microfiltração (0,45  $\mu\text{m}$ ) houve a retenção de lipases com atividade de hidrólise. Como o fator de concentração foi de 6 nesta etapa e não houve diferença significativa na atividade enzimática do retido e do permeado, pode-se dizer que houve a retenção de 17 % da enzima presente. Embora essas proteínas normalmente apresentem peso

molecular entre 20 kDa e 80 kDa, o fenômeno de incrustação com o bloqueio dos poros pode ter levado a essa retenção das enzimas.

A ultrafiltração com a membrana de 100 kDa levou à obtenção de um retido com atividade de hidrólise 4,3 vezes superior à sua alimentação, mostrando que o processo de separação por membranas é uma alternativa viável à concentração das lipases produzidas por fungos a partir de fermentação em estado sólido com resíduos agroindustriais. A atividade específica de hidrólise também aumentou 2,5 vezes após a realização dessa etapa do processo.

O permeado da ultrafiltração de 100 kDa e o retido da ultrafiltração de 50 kDa apresentaram uma atividade enzimática menor que as frações anteriores, mostrando que a maior parte das lipases produzidas pelo fungo foi retida na membrana de 100 kDa. Após a etapa de ultrafiltração com a membrana de 50 kDa não houve o registro de atividade de hidrólise, embora algumas partículas proteicas tenham permeado essa membrana.

As enzimas, como proteínas, possuem uma estrutura química bastante complexa. No caso das lipases podem ser encontrados de 250 a até 550 resíduos de aminoácidos fazendo com que a sua estrutura apresente áreas com maior ou menor afinidade pela estrutura da membrana (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). No caso deste trabalho, que utilizou membranas de ultrafiltração hidrofílicas de polietersulfona, houve uma elevada retenção de moléculas menores que 100 kDa na membrana com essa massa molar de corte. Deve-se enfatizar que o parâmetro conhecido como massa molar de corte das membranas de ultrafiltração considera a retenção de cerca de 90 % das partículas maiores que esse valor, sendo que os poros da membrana não são simétricos, havendo a presença de muitos poros menores e outros maiores que a média. Além disso, os parâmetros divulgados pelos fabricantes de membranas podem gerar resultados bastante diferentes em função da metodologia e das condições de teste utilizadas (CAUSSERAND et al., 2010).

Em relação à retenção da atividade de hidrólise, calculada levando em consideração a razão entre a atividade enzimática do permeado e do retido, verificou-se que não houve retenção significativa na primeira microfiltração e chegou a 22 % na segunda microfiltração. Na primeira ultrafiltração este índice foi de 92 %, atingindo 100 % de retenção da atividade de hidrólise na segunda ultrafiltração, tornando a última ultrafiltração desnecessária para o processo no que diz respeito à retenção de atividade enzimática.

A Tabela 5.3 apresenta os resultados de atividade de esterificação das amostras em cada etapa do processo de filtração sequencial, assim como as respectivas atividades específicas e retenções.

Tabela 5.3 – Resultados de atividade de esterificação das amostras em cada etapa do processo de separação sequencial por membranas

Processo	Amostra	Proteína (mg/mL)*	AE (U/mL)*	AE <sub>esp</sub> (U/mg)*	R <sub>AE</sub> (%)
Extração	Inicial	15,36 <sup>b</sup> ± 0,68	535,50 <sup>b</sup> ± 26,73	34,86 <sup>b</sup> ± 1,74	-
Microfiltração (20 µm)	Retido	14,26 <sup>b</sup> ± 1,36	146,16 <sup>d</sup> ± 26,73	10,25 <sup>d</sup> ± 1,87	-180,30
	Permeado	15,53 <sup>b</sup> ± 1,30	404,46 <sup>c</sup> ± 17,82	26,04 <sup>c</sup> ± 1,15	
Microfiltração (0,45 µm)	Retido	26,25 <sup>a</sup> ± 1,86	100,80 <sup>d</sup> ± 44,55	3,84 <sup>d</sup> ± 1,70	-103,69
	Permeado	10,06 <sup>c</sup> ± 1,86	192,80 <sup>d</sup> ± 34,08	19,17 <sup>c</sup> ± 3,39	
Ultrafiltração (100 kDa)	Retido	17,19 <sup>b</sup> ± 0,06	884,50 <sup>a</sup> ± 69,72	51,45 <sup>a</sup> ± 4,06	100,00
	Permeado	2,49 <sup>d</sup> ± 0,19	0,00 <sup>e</sup>	0,00 <sup>e</sup>	
Ultrafiltração (50 kDa)	Retido	3,94 <sup>d</sup> ± 0,00	0,00 <sup>e</sup>	0,00 <sup>e</sup>	-
	Permeado	2,54 <sup>d</sup> ± 0,12	0,00 <sup>e</sup>	0,00 <sup>e</sup>	
Ultrafiltração (20 kDa)	Retido	2,45 <sup>d</sup> ± 0,25	0,00 <sup>e</sup>	0,00 <sup>e</sup>	-
	Permeado	1,84 <sup>d</sup> ± 0,12	0,00 <sup>e</sup>	0,00 <sup>e</sup>	

AE: atividade de esterificação, AE<sub>esp</sub>: atividade específica de esterificação, R<sub>AE</sub>: Retenção da atividade de esterificação.

\*Resultados apresentados como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais na coluna não apresentam diferença significativa entre si com um nível de significância de 5%.

Observa-se que o extrato bruto inicial apresentou uma atividade de esterificação de 535 U/mL, significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que as amostras resultantes da primeira e da segunda microfiltração. A perda de atividade enzimática pode estar associada à tensão de cisalhamento incidente durante o processo de ultrafiltração, fato citado por Rodríguez-Fernández et al. (2013). De acordo com Argüello et al. (2003) outras duas razões também podem levar à diminuição da atividade enzimática após a realização de um processo de ultrafiltração: auto-hidrólise da enzima, fenômeno que é reduzido quando a solução contém outras proteínas ou peptídios além da enzima, e adsorção da enzima na membrana.

O retido da ultrafiltração de 100 kDa apresentou os maiores resultados tanto para a atividade de esterificação quanto para a atividade específica, indicando que as lipases produzidas na fermentação em estado sólido foram preferencialmente retidas nessa membrana, concentrando as enzimas, sendo que não houve permeação de lipases nessa membrana, caracterizando resultados de atividade de esterificação nulos a partir dessa etapa do processo.

A ultrafiltração com a membrana de 100 kDa levou à obtenção de um retido com atividade de esterificação 4,6 vezes superior à sua alimentação, valor semelhante ao obtido com as lipases com atividade de hidrólise. A atividade específica de esterificação também aumentou 2,7 vezes após a realização dessa etapa do processo.

Em relação à retenção da atividade de esterificação, calculada levando em consideração a razão entre a atividade enzimática do permeado e do retido, verificou-se que a retenção das duas etapas de microfiltração foi negativa, ou seja, houve diminuição da atividade enzimática do retido após a realização de cada processo. Na ultrafiltração com a membrana de 100 kDa o índice atingiu 100 % de retenção da atividade de esterificação, em virtude da ausência de permeação nessa etapa de moléculas com esse tipo de atividade enzimática.

O contraste dos resultados de atividade de hidrólise em relação aos resultados de atividade de esterificação no permeado da membrana de 100 kDa indica que foram produzidas lipases distintas, com características de permeação diferentes.

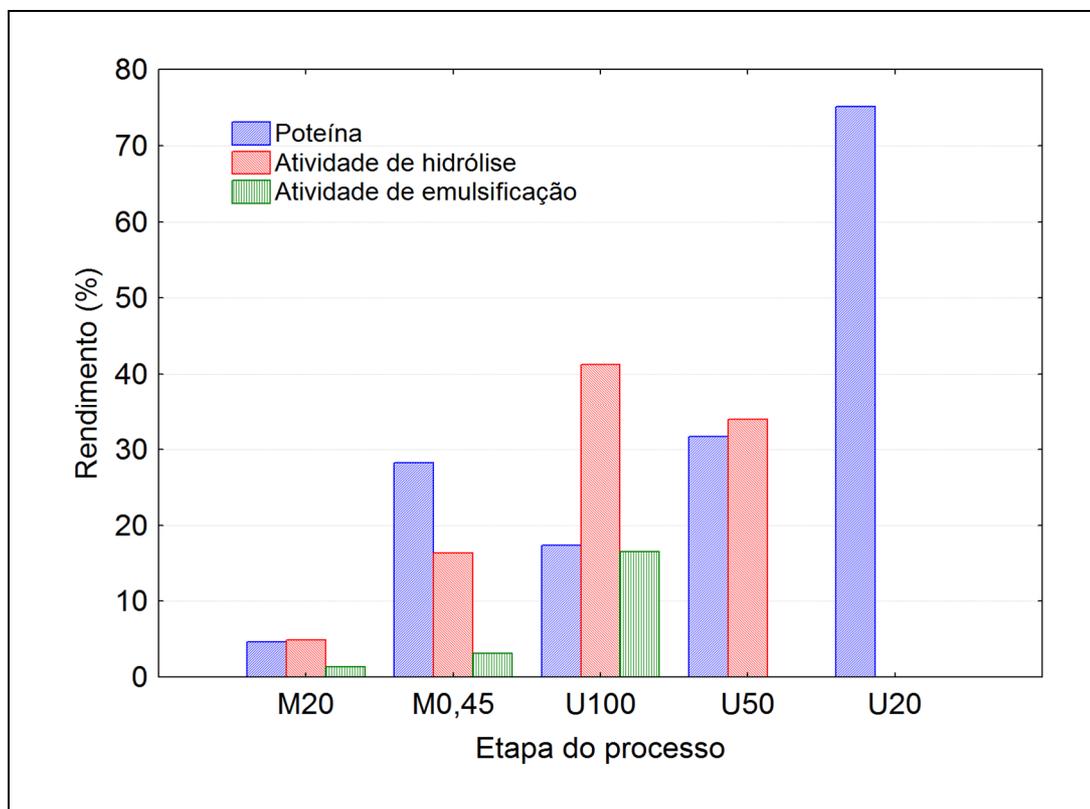
Silva et al. (2011) produziram e concentraram lipases produzidas por *Penicillium brevicompactum* em fermentação em estado sólido com resíduos agroindustriais. A otimização do processo levou à produção de enzimas com atividade de hidrólise de até 88 U/g com farelo de mamona, sendo obtida maior atividade de esterificação de até 244 U/g com torta de babaçu. Os autores verificaram que não houve correlação entre a atividade de hidrólise e a atividade de esterificação, sendo obtidos resultados otimizados em diferentes condições de cultivo. Rigo et al. (2010) também verificaram que as melhores condições de obtenção de lipases com atividade de hidrólise não necessariamente são as mesmas para a obtenção de lipases com atividade de esterificação. Esta constatação é fundamental para a produção de enzimas por processos biotecnológicos, pois podem ser produzidas enzimas pelo mesmo microrganismo com diferentes aplicações industriais, bastando adequar as condições de cultivo.

Em outros trabalhos relacionados à produção de lipases com fungos filamentosos a atividade enzimática apresentou valores bastante distintos em comparação aos obtidos neste trabalho. Almeida, Taulk-Tornisielo e Carmona (2013) avaliaram a influência do meio de cultivo para a produção de lipases, sendo efetuada uma triagem inicial com 90 diferentes fungos. O fungo *Aspergillus niger* avaliado apresentou uma atividade específica de hidrólise de 7,5 U, enquanto que outras cepas de *Aspergillus* sp. mostraram atividade de até 6,4 U. Rigo et al. (2010) selecionaram e isolaram microrganismos com potencial para produção de lipases com atividade de esterificação utilizando fermentação em estado sólido com farelo de

soja como substrato. Dentre os 203 microrganismos utilizados 2 fungos filamentosos produziram enzimas com atividade de esterificação de até 115 U/g, sendo potenciais produtores de lipases. Conforme citado por Silva et al. (2011) as diferenças encontradas na literatura, em relação aos valores absolutos de atividade enzimática, tanto de hidrólise quanto de esterificação, podem variar não apenas em virtude do microrganismo, da matéria-prima e das condições de produção, mas também em função das condições experimentais utilizadas para a sua determinação.

O rendimento relacionado aos três parâmetros (concentração de proteínas, atividade de hidrólise e atividade de esterificação) em cada etapa da filtração sequencial pode ser visualizado na Figura 5.4. Observa-se que na última ultrafiltração foi obtido um rendimento percentual de proteína superior a 70 %, ou seja, a quantidade total de proteínas no retido foi equivalente a 70 % da quantidade total de proteínas presente na alimentação dessa etapa da filtração, sendo que os demais 30 % de proteínas estavam no permeado ou permaneceram retidos na própria membrana.

Figura 5.4 – Rendimento após os processos de microfiltração com membranas de 20  $\mu\text{m}$  (M20) e de 0,45  $\mu\text{m}$  (M0,45) e ultrafiltração com membranas de 100 kDa (U100), 50 kDa (U50) e 20 kDa (U20)



Fonte: elaborada pelo autor.

Verifica-se também que os maiores rendimentos de atividade de hidrólise e de atividade de esterificação foram obtidos na ultrafiltração com a membrana de 100 kDa. Nesta etapa o rendimento da atividade de esterificação foi de cerca de 20 %, enquanto que o rendimento relacionado à atividade de hidrólise foi superior a 40 %. Deve-se evidenciar que, embora os rendimentos não tenham sido tão elevados, o retido desta ultrafiltração apresentou uma atividade de hidrólise 4 vezes superior ao extrato inicial, e uma atividade de esterificação também 1,7 vez superior.

Bharti et al. (2013) produziram e purificaram lipases a partir de *Aspergillus japonicus*, verificando que a atividade do extrato bruto foi de 2,5 U/mg. Após a purificação por cromatografia houve um aumento na atividade enzimática, mas o rendimento foi de 43 %, em virtude de perdas ocorridas nas etapas de precipitação e purificação, resultando semelhante ao obtido neste trabalho.

Rodríguez-Fernández et al. (2013) concentraram a enzima fitase produzida por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido utilizando um processo de ultrafiltração com membrana de 10 kDa. Os autores obtiveram um fator de concentração volumétrica de 6 vezes em relação ao extrato inicial, sendo que o retido apresentou o dobro da concentração de proteínas e uma atividade enzimática 4,3 vezes superior. A retenção foi de 99,95 % e o rendimento indicou que 14 % da atividade foi perdida durante o processo, provavelmente pela tensão de cisalhamento inerente ao processo de filtração tangencial. Os autores enfatizaram que a presença de alguns íons pode apresentar efeito inibitório na atividade enzimática, sendo útil a eliminação desses íons no permeado para melhorar o resultado.

Golunski et al. (2011) concentraram a enzima inulinase, produzida por *Kluyveromyces marxianus* em fermentação em estado sólido utilizando um processo de ultrafiltração com membrana de 100 kDa. Este processo apresentou um fator de purificação de 5,5 vezes, com 86 % de rendimento. Conforme tais autores, a variação do rendimento da atividade enzimática também pode ser atribuído à eliminação ou concentração de possíveis inibidores que poderiam permanecer na solução retida ou permeada, além de poder ocorrer perda de enzima na superfície da membrana em função da incrustação formada.

Gottschalk, Bon e Nobrega (2008) utilizaram processos de ultrafiltração com membranas de polissulfona e acetato de celulose com massa molares de corte de 10 kDa, 20 kDa e 50 kDa para concentrar a enzima lignina peroxidase produzida por *Streptomyces viridosporus*. Os resultados mostraram uma elevada retenção (superior a 96 %) para as membranas de polissulfona de 10 kDa e 20 kDa, enquanto que a membrana de 50 kDa apresentou retenção de 58 %. A membrana de acetato de celulose de 20 kDa apresentou

rejeição de 77 % e mostrou um menor decréscimo na permeabilidade total, sugerindo menor adsorção e bloqueio de poros nessa membrana. Os rendimentos obtidos relacionados à atividade enzimática foram de 15 %, 52 % e 74 % com as membranas de polissulfona de 50 kDa, 20 kDa e 10 kDa, respectivamente, e de 67 % com a membrana de acetato de celulose de 20 kDa.

Krstic et al. (2007) realizaram a ultrafiltração de uma solução de endo-pectinase para sua concentração. Os autores obtiveram diferentes rendimentos em função dos fatores de concentração volumétrica (FCV) utilizados, chegando inicialmente a rendimentos da ordem de 33 % com FCV igual a 1,5 e de 7 % quando o FCV foi 3. Após modificações nas condições de filtração, como pressão, temperatura, agitação, viscosidade e tempo de processo o rendimento foi aumentado sensivelmente, chegando a valores superiores a 90 %, mostrando que a otimização do processo foi possível.

Esses resultados evidenciam que os próximos estudos deverão estar relacionados à otimização das condições de filtração, com a busca das melhores condições de temperatura, pressão e velocidade da alimentação, para melhorar ainda mais os aspectos vinculados à separação e concentração de lipases produzidas por fungos por fermentação em estado sólido, a fim de diminuir as perdas que ocorreram neste trabalho.

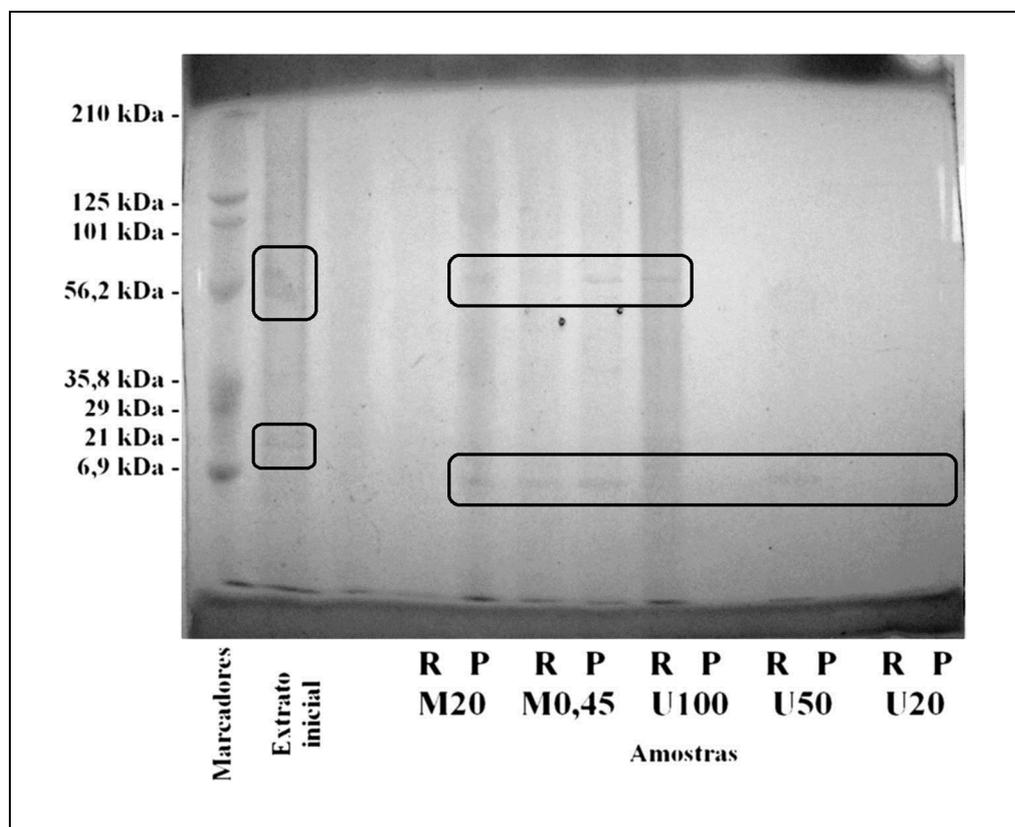
A Figura 5.5 apresenta o gel de poliacrilamida com as diferentes frações do processo de filtração sequencial do extrato enzimático, em conjunto com os marcadores de peso molecular entre 6,9 kDa e 210 kDa.

O extrato bruto inicial mostrou um elevado número de bandas proteicas estendidas e espalhadas na faixa de trabalho, indicando que havia uma mistura bastante complexa com diversas proteínas e/ou enzimas presentes, compatível com o que é observado nas amostras iniciais de trabalhos que envolvem processos de purificação de enzimas (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2005). Percebe-se, entretanto, a intensificação de algumas bandas nesse extrato, podendo-se dizer que havia uma maior quantidade de proteínas na faixa de 50 kDa a 60 kDa e outra com cerca de 20 kDa.

Este perfil se repete nas duas microfiltrações realizadas, sendo também observada a intensificação de uma banda no permeado da segunda microfiltração (membrana de 0,45  $\mu$ m) e no retido da primeira ultrafiltração (membrana de 100 kDa). Este componente tem aproximadamente 60 kDa de peso molecular, o que é indicativo da presença da enzima lipase, pois a maior quantidade de proteínas e a maior atividade enzimática foram obtidas no retido da primeira ultrafiltração. De acordo com Singh e Mukhopadhyay (2012) a maioria das

lipases apresentam peso molecular médio entre 20 kDa e 80 kDa, embora já tenham sido reportadas enzimas com 12 kDa e também com 270 kDa.

Figura 5.5 – Eletroforese das amostras iniciais e finais (R: retido, P: permeado) dos processos de microfiltração (M20 e M0,45) e ultrafiltração (U100, U50 e U20) utilizando membranas



Bharti et al. (2013), ao purificarem e caracterizarem a lipase produzida por *Aspergillus japonicus*, verificaram que ela apresentou um peso molecular aproximado de 40 kDa. Fernández-Lorente et al. (2005) purificaram diferentes lipases oriundas de *Aspergillus niger* com métodos de adsorção, sendo que várias bandas foram visualizadas na análise preliminar do extrato bruto inicial, indicando a presença de proteínas com pesos moleculares distintos. Após a purificação foram identificadas três lipases com os seguintes pesos moleculares: 31 kDa, 43 kDa e 65 kDa, sendo que todas apresentaram diferentes graus de seletividade. Coradi et al. (2013) produziram lipases com resíduos agroindustriais através de fermentação em estado sólido usando o fungo *Trichoderma harzianum*. A eletroforese em gel de agarose do extrato enzimático mostrou uma banda mais intensa com cerca de 48 kDa e duas bandas mais fracas com pesos moleculares pouco superiores a 66 kDa. Como não foi efetuada a separação

posterior dessas proteínas as bandas mais fracas podem ser indicativas da presença de outras lipases com características distintas.

A eletroforese das amostras de retidos e permeados da filtração (Figura 5.5) mostrou também que alguns peptídios de baixo peso molecular (menor que 10 kDa) permaneceram nas amostras de permeado, mesmo após a última ultrafiltração. Este resultado corrobora a quantidade de nitrogênio orgânico de origem proteica presente no permeado da ultrafiltração de 20 kDa, embora estes peptídios não apresentem atividade enzimática.

### 5.2.3 Caracterização dos processos sequenciais de filtração

A permeabilidade hidráulica das membranas utilizadas no trabalho é apresentada na Tabela 5.4. Observa-se um comportamento linear para a relação do fluxo de permeado em relação à pressão transmembrana aplicada, em especial para as membranas de ultrafiltração. A permeabilidade diminui à medida que o tamanho do poro aumenta, já que a permeabilidade é inversamente proporcional à resistência da membrana à filtração. Os resultados mostram que um aumento da pressão na ordem de 100 kPa proporciona um aumento de fluxo de permeado de cerca de 16000 L/m<sup>2</sup>.h para a membrana de 20 µm, 4500 L/m<sup>2</sup>.h para a membrana de 0,45 µm, 770 L/m<sup>2</sup>.h para a membrana de 100 kDa, 270 L/m<sup>2</sup>.h para a membrana de 50 kDa e 25 L/m<sup>2</sup>.h para a membrana de 20 kDa.

Tabela 5.4 – Permeabilidade hidráulica das membranas de microfiltração e ultrafiltração utilizando água deionizada em diferentes pressões

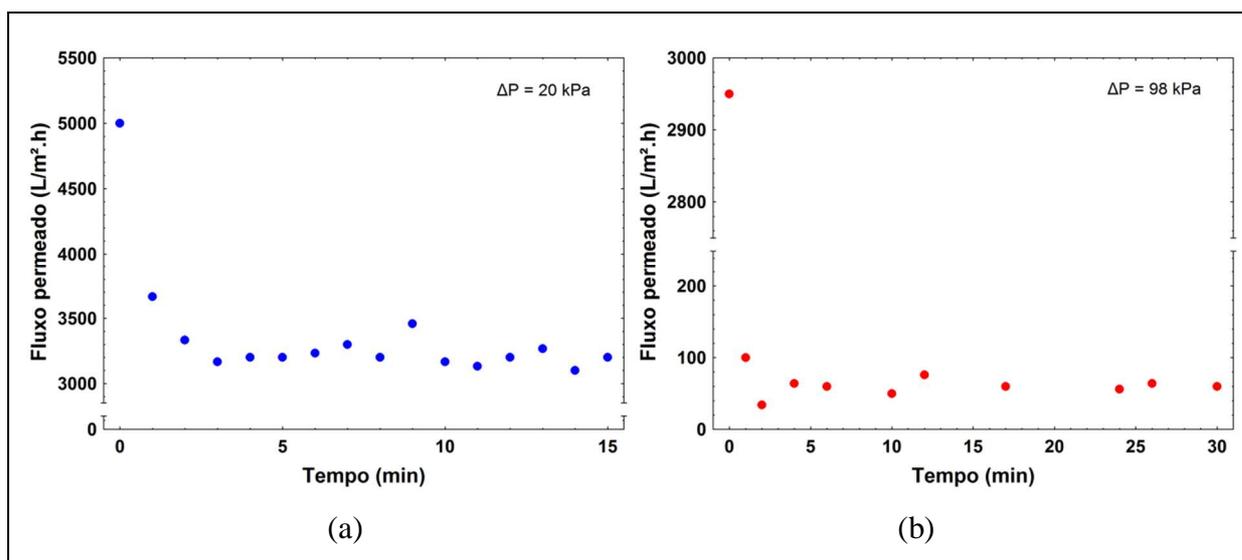
Membrana	Permeabilidade hidráulica (L/m <sup>2</sup> .kPa.h)	Pressão de trabalho (kPa)	Coefficiente de correlação (r)
Microfiltração (20 µm)	161,92	0 a 69	0,9273
Microfiltração (0,45 µm)	45,41	0 a 98	0,9195
Ultrafiltração (100 kDa)	7,67	0 a 98	0,9761
Ultrafiltração (50 kDa)	2,71	0 a 98	0,9860
Ultrafiltração (20 kDa)	0,25	0 a 196	0,9937

Em relação aos valores de permeabilidade hidráulica fornecidos pelos fabricantes das membranas houve uma diferença de aproximadamente 50 %. Conforme Susanto (2007) as diferenças entre as características observadas e as descritas comercialmente podem ser explicadas por diferenças em um ou mais dos seguintes aspectos: material da membrana,

condições de formação e resultante estrutura da membrana, assim como os métodos de caracterização utilizados pelos fabricantes.

A Figura 5.6 apresenta as curvas de fluxo permeado para os processos sequenciais de microfiltração do extrato enzimático. Observa-se que houve uma queda acentuada no fluxo no primeiro minuto de filtração, característica do fenômeno de polarização por concentração. A queda foi menos acentuada na primeira microfiltração (sob pressão de 20 kPa), mantendo um fluxo superior a 60 % do fluxo de água, em virtude do tamanho do poro ser de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ . A segunda microfiltração demonstrou uma redução de fluxo maior, de cerca de 98 % após 5 minutos de processo, apresentando valores similares aos processos de ultrafiltração posteriores.

Figura 5.6 – Curvas de fluxo permeado durante os processos de microfiltração utilizando membranas planas de (a) 20  $\mu\text{m}$  e (b) 0,45  $\mu\text{m}$



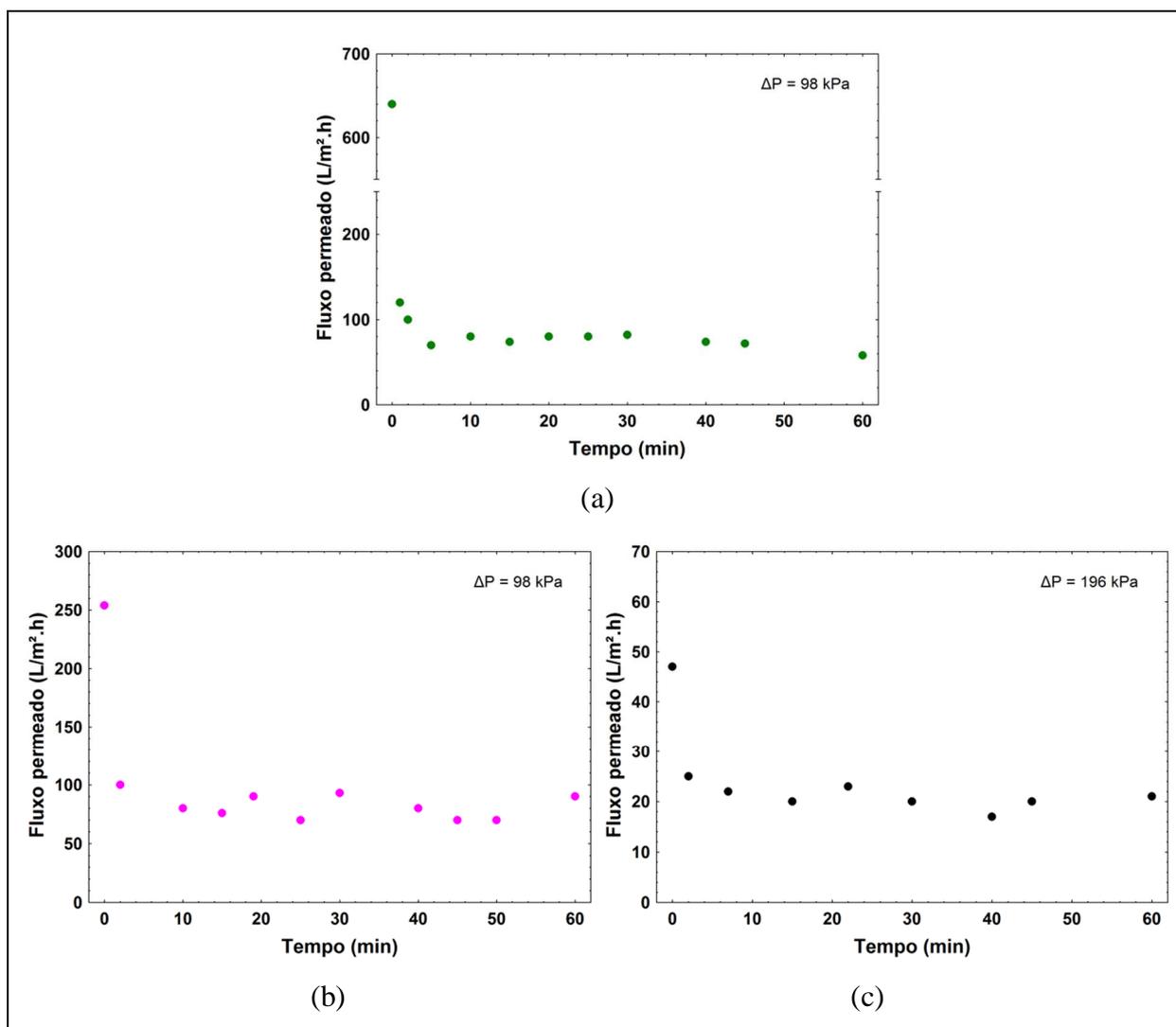
Fonte: elaborada pelo autor.

A diminuição do fluxo é atribuída a dois mecanismos principais: bloqueio de poros, responsável pela queda brusca inicial do fluxo, e formação de torta, responsável pela queda gradual de longo prazo. Conforme Song (1998) vários fatores podem afetar esse declínio no fluxo, sendo que o ideal é a busca de uma situação de equilíbrio na pressão de trabalho, de forma a evitar que se forme uma incrustação excessiva na membrana.

A Figura 5.7 apresenta o perfil de fluxo permeado para os processos sequenciais de ultrafiltração do extrato enzimático. A primeira e a segunda ultrafiltração mostraram fluxos médios entre 75 L/m<sup>2</sup>.h e 80 L/m<sup>2</sup>.h após os primeiros minutos de filtração, levando a uma

redução de fluxo de cerca de 88 % e de 69 %, respectivamente. A terceira ultrafiltração apresentou uma redução de fluxo da ordem de 57 % após os primeiros minutos de processo.

Figura 5.7 – Curvas de fluxo permeado durante os processos de ultrafiltração utilizando membranas planas de (a) 100 kDa, (b) 50 kDa e (c) 20 kDa



Fonte: elaborada pelo autor.

Apesar da acentuada queda de fluxo da segunda microfiltração todos os processos sequenciais de microfiltração e de ultrafiltração mostraram fluxos de permeado acima de 20 L/m<sup>2</sup>.h, que são considerados valores adequados para a utilização em processos industriais, como a concentração de sucos (SÁ; CABRAL; MATTA, 2003). A viabilidade de qualquer processo de concentração por membranas depende, fundamentalmente, das condições envolvidas no processo como as propriedades da membrana, afinidade membrana-soluto, temperatura da solução e pressão transmembrana (MELLO; PETRUS; HUBINGER, 2010).

Chaiklahan et al. (2011) utilizaram processos sequenciais de microfiltração e ultrafiltração para separar e concentrar ficocianina, que apresenta peso molecular entre 44 e 260 kDa, a partir de extratos aquosos de microalgas. Os autores não obtiveram redução de fluxo de permeado quando utilizaram uma membrana de microfiltração de polipropileno de 5  $\mu\text{m}$ , mas com a membrana de fluoreto de polivinilideno de 0,2  $\mu\text{m}$  houve uma redução de fluxo de cerca de 90 %. Quando foi realizada a ultrafiltração com membranas de polietersulfona de 50 kDa, 70 kDa e 100 kDa os fluxos de permeado demonstraram uma redução menor, mantendo-se em pelo menos 50 L/m<sup>2</sup>.h. O uso de pressão de 138 kPa com a membrana de 50 kDa induziu a formação de torta ou gel na superfície da membrana, resultando na retenção de ficocianina e proteína, conseqüentemente reduzindo o fluxo de permeado. Os autores optaram por utilizar a metade da pressão para minimizar o efeito de formação de incrustação.

Bacchin, Aimar e Field (2006) mostraram que, dependendo da relação entre o tamanho do soluto e o tamanho do poro, três casos de incrustação podem ocorrer: diminuição dos poros por adsorção, quando o soluto é muito menor que o poro; bloqueio de poros, quando os tamanhos são similares; formação de camada gel e posterior formação de torta, quando o soluto é muito maior que o poro. Em processos de microfiltração de proteínas há a tendência de ocorrer mais incrustação interna (adsorção), enquanto que na ultrafiltração ocorrerá o bloqueio dos poros, explicando o fenômeno observado no trabalho.

Chaiklahan et al. (2011) também mostraram que em cada etapa de filtração havia perda de ficocianina, chegando a 25 % na microfiltração, mas que a utilização de processos sequenciais de microfiltração (com membranas de 5  $\mu\text{m}$  e 0,2  $\mu\text{m}$ ) e de ultrafiltração (com membrana de 50 kDa) é viável tecnicamente e pode apresentar custos menores que os obtidos com processos de purificação envolvendo precipitação e cromatografia.

Os processos de filtração dos extratos enzimáticos foram realizados com pressões que variaram de 20 kPa a 196 kPa, sendo que os resultados médios de fluxo de permeado após os primeiros 5 minutos de filtração são apresentados na Tabela 5.5, assim como a recuperação de fluxo obtida após a lavagem com água em cada etapa de filtração.

A membrana de microfiltração de 20  $\mu\text{m}$  e a membrana de ultrafiltração de 100 kDa apresentaram uma recuperação de fluxo considerável (74 % e 88 %, respectivamente), após o processo de lavagem com água. Deve-se salientar que foi efetuada apenas uma lavagem com água por cerca de 10 minutos a fim de retirar a incrustação do depósito, caracterizada pelos fenômenos de polarização de concentração e formação de torta. Apesar da recuperação de fluxo ter sido menor nas outras membranas deve ser enfatizado que em maior escala são

realizados processos de limpeza nas membranas utilizando agentes químicos detergentes, oxidantes e até enzimas, a fim de retirar as partículas mais fortemente aderidas à membrana.

Tabela 5.5 – Resultados de fluxo permeado dos extratos contendo lipases e recuperação do fluxo após filtração e lavagem com água

<b>Processo</b>	<b>Fluxo permeado (L/m<sup>2</sup>.h)*</b>	<b>Pressão de trabalho (kPa)</b>	<b>Recuperação do fluxo (%)**</b>
Microfiltração (20 µm)	3223,5 ± 95,5	20	74
Microfiltração (0,45 µm)	60,9 ± 8,0	98	12
Ultrafiltração (100 kDa)	74,4 ± 7,5	98	88
Ultrafiltração (50 kDa)	79,9 ± 9,3	98	59
Ultrafiltração (20 kDa)	20,4 ± 1,9	196	49

\* A partir de 5 min de filtração

\*\* Após lavagem com água

Peeva et al. (2012) efetuaram a separação de proteínas (albumina e mioglobina) por ultrafiltração tangencial com membranas de polietersulfona normal e modificada. Foi obtida uma recuperação de fluxo de cerca de 50 % para as membranas de polietersulfona de 10 kDa, 30 kDa e 50 kDa após três etapas de limpeza com água e NaOH, mostrando uma recuperação da membrana inferior à obtida neste trabalho, mesmo sem utilizar detergentes. Os autores observaram efeitos de forças de atração e repulsão entre as proteínas e as membranas apenas no início do processo de filtração, sendo que após alguns minutos as membranas apresentaram fluxos e rejeições semelhantes mesmo com pH diferente, devido à formação de incrustação e atração eletrostática entre as próprias proteínas na densa camada de torta, diminuindo a seletividade do processo.

A Tabela 5.6 apresenta as resistências total, da membrana, da incrustação (deposição irreversível na membrana, por adsorção ou bloqueio interno de poros) e do depósito (deposição reversível e/ou polarização por concentração) ao fluxo de permeado. A avaliação das resistências em série foi utilizada para determinar a proporção de contribuição de cada parcela para a redução do fluxo de permeado.

À medida que o tamanho do poro (ou massa molecular de corte) das membranas diminuiu houve um aumento na resistência da membrana. A membrana de microfiltração de 0,45 µm apresentou uma resistência 4,6 vezes menor que a membrana de ultrafiltração de 100 kDa, enquanto que esta membrana apresentou uma resistência 27,2 vezes superior que a

membrana de ultrafiltração de 20 kDa. Os resultados das resistências das membranas são coerentes com os obtidos para a permeabilidade hidráulica, a qual diminuía à medida que o tamanho do poro diminuía, já que a resistência é inversamente proporcional à permeabilidade.

Tabela 5.6 – Resistências calculadas para os processos de microfiltração e ultrafiltração das lipases produzidas por *Aspergillus niger* O-4 através de fermentação em estado sólido

Processo	$R_t$ ( $10^{12} \text{ m}^{-1}$ )	$R_m$ ( $10^{12} \text{ m}^{-1}$ )	$R_i$ ( $10^{12} \text{ m}^{-1}$ )	$R_d$ ( $10^{12} \text{ m}^{-1}$ )
Microfiltração (20 $\mu\text{m}$ )	0,022	0,014	0,005	0,003
Microfiltração (0,45 $\mu\text{m}$ )	5,797	0,120	0,878	4,800
Ultrafiltração (100 kDa)	4,745	0,552	0,075	4,118
Ultrafiltração (50 kDa)	4,418	1,390	0,966	2,063
Ultrafiltração (20 kDa)	34,612	15,023	15,636	3,953

$R_t$ : resistência total,  $R_m$ : resistência da membrana,  $R_i$ : resistência da incrustação,  $R_d$ : resistência do depósito.

Com exceção da primeira microfiltração do extrato enzimático, que apresentou um valor de resistência total mais de 100 vezes inferior, os demais processos de filtração tiveram resistência superior a  $4 \times 10^{12} \text{ m}^{-1}$ . As resistências do primeiro e do segundo processo de ultrafiltração foram inferiores à da segunda microfiltração porque neste processo houve a retenção de partículas que provocariam uma resistência elevada nos processos subsequentes a partir do bloqueio completo de poros e consequente formação de torta. Estes resultados mostram a vantagem de serem efetuadas filtrações sequenciais com a diminuição gradual do poro da membrana para evitar um aumento excessivo na resistência do processo quando utilizada diretamente uma membrana de ultrafiltração, levando também à diminuição de sua vida útil.

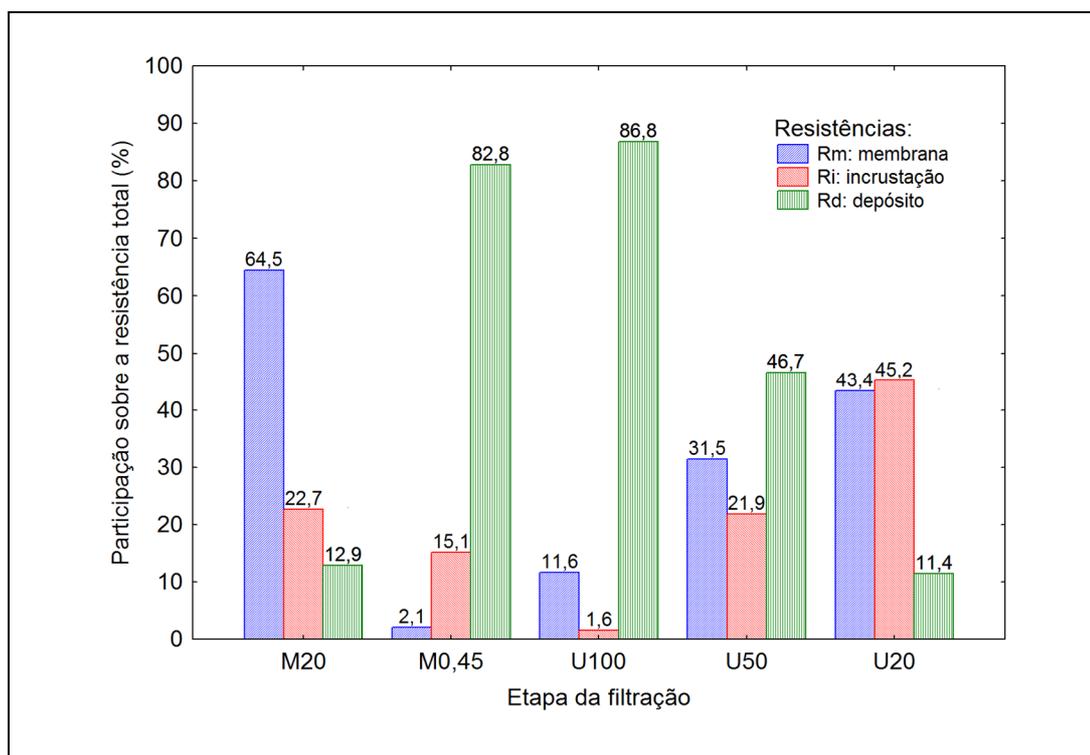
A resistência da incrustação, caracterizada pelo bloqueio interno dos poros ou pela adsorção irreversível na membrana, foi maior na segunda microfiltração e na terceira ultrafiltração. O bloqueio interno dos poros na membrana de 20 kDa pode ser explicado pela presença de peptídios pequenos nessa etapa, ficando adsorvidos na estrutura interna da membrana.

A resistência do depósito, caracterizada pela camada responsável pela polarização por concentração e pela torta posterior formada, foi cerca de mil vezes menor na primeira microfiltração, pois este processo apresentou a menor diminuição do fluxo em relação aos demais, em virtude do tamanho do poro (20  $\mu\text{m}$ ). Os quatro processos sequenciais de filtração

apresentaram resistência do depósito entre  $2,1 \times 10^{12} \text{ m}^{-1}$  e  $4,8 \times 10^{12} \text{ m}^{-1}$ , indicando que boa parte da incrustação pode ser removida das membranas a partir de processos simples de limpeza. Brião e Tavares (2012) avaliaram o mecanismo de bloqueio de poros em processo de ultrafiltração de efluente de laticínios. A filtração do efluente, rico em componentes proteicos, com elevado peso molecular, apresentou características de bloqueio externo de poros, podendo ser removida por processos simplificados de lavagem e viabilizando a reutilização da membrana.

A Figura 5.8 apresenta a contribuição percentual de cada resistência nos diferentes processos de filtração utilizados. Na primeira microfiltração observa-se que a resistência principal foi da membrana (64,5 %), o que pode ser explicado pela pequena quantidade de partículas em suspensão com tamanho próximo ao do poro, que era de 20  $\mu\text{m}$  (BACCHIN; AIMAR; FIELD, 2006).

Figura 5.8 – Contribuição percentual da resistência da membrana, da incrustação e do depósito sobre a resistência total dos processos de microfiltração (M20 e M0,45) e ultrafiltração (U100, U50 e U20) utilizados



Fonte: elaborada pelo autor.

As duas filtrações seguintes (com membranas de 0,45  $\mu\text{m}$  e de 100 kDa) apresentaram mais de 80 % da resistência em função do depósito, ou seja, partículas que ficam adsorvidas na superfície da membrana gerando o efeito de polarização por concentração e partículas

posteriores formando uma torta, características de processos de filtração com partículas de tamanho semelhante ou pouco maiores que o poro. Apesar do fluxo de permeado apresentar uma queda acentuada nestes processos, as partículas presentes no depósito podem ser removidas por processos simples de lavagem com água, permitindo que as membranas sejam reaproveitadas posteriormente. O processo utilizando a membrana de 20 kDa mostrou que quase 90 % da resistência à filtração foram ocasionados pela membrana e pela incrustação interna, que é mais difícil de ser removida, fenômeno característico da presença de partículas menores que o poro e com afinidade pela membrana, que é o caso de pequenos peptídios e aminoácidos na membrana hidrofílica de polietersulfona.

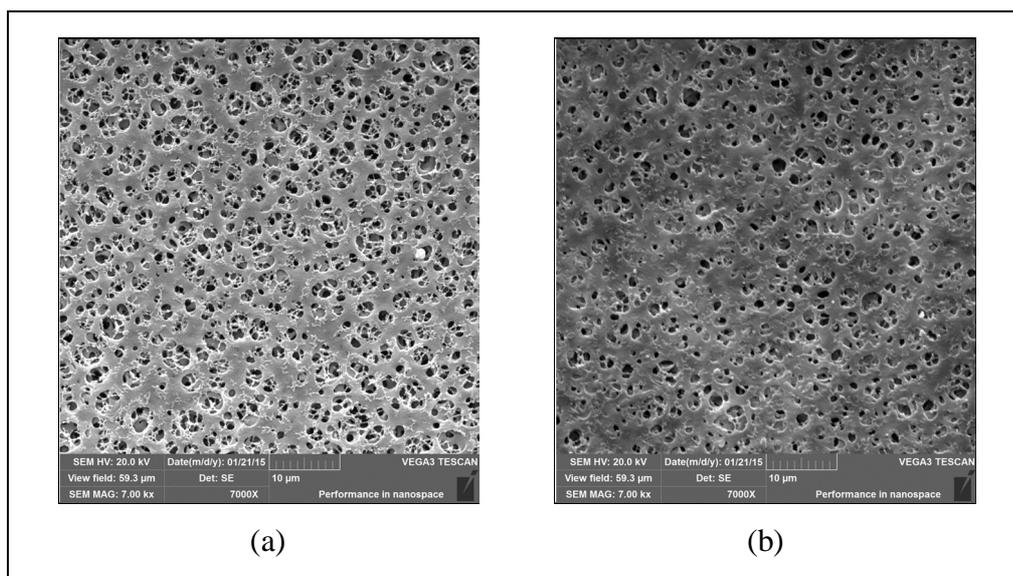
Para o processo de filtração do extrato enzimático, não seria necessário realizar esta última etapa, pois as lipases já foram separadas e concentradas anteriormente. A eliminação da última ultrafiltração tornaria o processo menos oneroso tanto do ponto de vista de tempo de filtração quanto pelo trabalho posterior de limpeza da membrana, levando conseqüentemente a um custo menos elevado do processo.

Hwang e Chiang (2014) efetuaram a separação de proteínas e polissacarídios por filtração tangencial utilizando membranas com diferentes morfologias. Os autores compararam membranas de ésteres de celulose (EC), fluoreto de polivinilideno (PVDF) e policarbonato (PC) de 0,1  $\mu\text{m}$ . A membrana de PVDF apresentou fluxo de permeado até 30 % superior, apresentando uma resistência de formação de torta (reversível) semelhante à membrana de policarbonato e superior à membrana de ésteres de celulose. Os resultados mostraram que as moléculas de proteínas formaram depósitos na superfície das membranas, enquanto que os polissacarídios foram adsorvidos na membrana e nas paredes internas dos poros. A resistência da incrustação interna (irreversível) da membrana de ésteres de celulose ao processo foi três vezes superior à resistência das outras membranas quando efetuado o processo de filtração com pressão de 60 kPa e velocidade de 0,5 m/s. Este fenômeno foi atribuído principalmente à estrutura esponjosa e rugosa da membrana de ésteres de celulose, com poros maiores na superfície. Os resultados de Hwang e Chiang (2014) são semelhantes aos observados neste trabalho com a membrana de acetato de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$ , que apresentou elevada resistência do depósito, maior que da incrustação e bem maior que da membrana.

A Figura 5.9 apresenta a visualização por microscopia eletrônica de varredura da superfície da membrana de microfiltração de 0,45  $\mu\text{m}$  antes e depois do processo realizado. As micrografias revelam que a membrana de microfiltração apresenta estrutura porosa com superfície rugosa. Hwang e Chiang (2014), ao caracterizarem a morfologia de membranas de

microfiltração, mostraram que as estruturas das membranas de fluoreto de polivinilideno, de policarbonato e de ésteres de celulose eram diferentes, tanto na superfície quanto na seção transversal. A membrana de ésteres de celulose avaliada apresentou uma estrutura muito semelhante à obtida neste trabalho, com membranas de microfiltração do mesmo material.

Figura 5.9 – Microscopia eletrônica de varredura da superfície da membrana de microfiltração de 0,45  $\mu\text{m}$  utilizada no processo: (a) antes da filtração e (b) depois da filtração

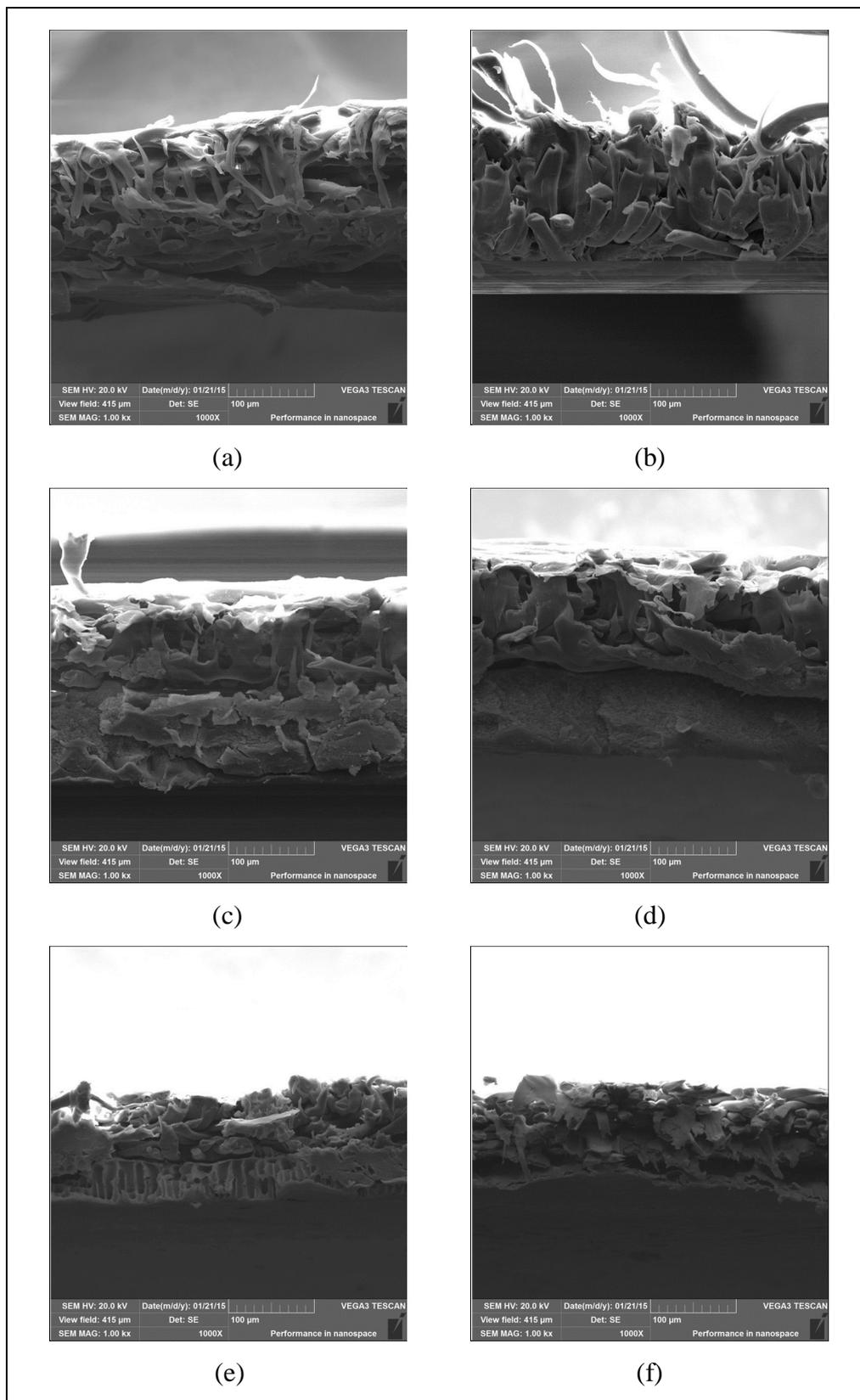


Fonte: elaborada pelo autor.

A redução da quantidade de poros da membrana de microfiltração após a realização do processo é claramente observada, em especial na entrada dos poros, mais próximo à superfície. A deposição de partículas e consequente redução da quantidade de poros também foi visualizada por Rosas et al. (2014), que avaliaram a incrustação em uma membrana de microfiltração de polietersulfona de 0,22  $\mu\text{m}$  após a filtração de uma suspensão bacteriana.

A visualização por microscopia eletrônica de varredura das seções transversais das membranas de ultrafiltração é apresentada na Figura 5.10. Observa-se a presença de um suporte para assegurar a resistência mecânica da membrana, assim como uma camada de pele que assegura a sua seletividade, sendo que as três membranas utilizadas apresentaram estrutura assimétrica. A membrana de 100 kDa apresentou macrovazios na subcamada, o que poderia diminuir a resistência à permeação. Apesar disto, a estrutura esponjosa espessa acaba sendo responsável pela elevada resistência, diminuindo o fluxo de permeado.

Figura 5.10 – Microscopia eletrônica de varredura da seção transversal das membranas de ultrafiltração de: 100 kDa antes (a) e depois (b), 50 kDa antes (c) e depois (d), 20 kDa antes (e) e depois (f) do processo



Fonte: elaborada pelo autor.

Após a realização dos processos de separação as membranas de 50 kDa e de 20 kDa apresentaram um grau de compactação maior, resultante da incrustação interna ocasionada por partículas menores que ficaram adsorvidas nas paredes internas. A adsorção molecular nas paredes dos poros resulta em uma redução do tamanho do poro e conseqüente aumento da resistência por incrustação, diminuindo o fluxo de permeado, conforme comentado anteriormente.

A morfologia das membranas de ultrafiltração de polietersulfona observadas neste trabalho é consistente com os resultados obtidos por Mozia et al. (2014) e Arahman et al. (2012), que também observaram que a morfologia desse tipo de membrana pode ser modificada pela adição de aditivos poliméricos a fim de aumentar os macrovazios ou alterar a hidrofiliçidade da membrana.

Observou-se também que as membranas de polietersulfona utilizadas neste trabalho apresentaram uma estrutura diferente em relação às membranas de ultrafiltração de polissulfona (ESPINOZA-GÓMEZ; LIN, 2003), poliestireno (RAMOS-OLMOS et al., 2008), cerâmica (WYART et al., 2008), poliamida e polissulfona (TRES et al., 2010), poliamida (POLETTTO et al., 2012), tereftalato de polietileno (RAJESH; MURTHY, 2014), indicando possíveis diferenças entre as suas características de seletividade e permeação.

Essas observações são importantes para a escolha da membrana que pode ser utilizada em processos de separação e concentração de proteínas. As diferenças existentes entre as membranas, mesmo a partir de material semelhante, são oriundas de métodos de obtenção distintos. As interações entre o material a ser filtrado e a membrana também podem ser modificados a partir de alterações efetuadas quimicamente e/ou fisicamente mesmo após a fabricação das membranas, fazendo com que a membrana tenha suas propriedades de hidrofiliçidade e seletividade diferentes das originais (IRFAN et al., 2014; RAZZAGHI et al., 2014). Esta ressalva abre uma gama infinita de possibilidades de estudos relacionados a aplicações práticas do uso de membranas em diversas áreas.

### **5.3 CONCLUSÕES DESTA ETAPA**

A fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais e o fungo *Aspergillus niger* O-4 proporcionou a produção de lipases com atividade de hidrólise de 20,24 U/mL e com atividade de esterificação de 535,50 U/mL de extrato. A combinação de microfiltração e de ultrafiltração levou à obtenção de concentrados com atividade de hidrólise 3 vezes superior e com atividade de esterificação 1,7 vez superior às obtidas no extrato inicial.

A eletroforese em gel de poliacrilamida permitiu identificar uma lipase com cerca de 60 kDa de peso molecular, tendo sido completamente retida na etapa de ultrafiltração com membrana de 100 kDa.

A utilização de processos sequenciais de separação por membranas tornou possível a manutenção de fluxos de permeado superiores a 60 L/m<sup>2</sup>.h na microfiltração com membrana de 0,45 µm, de 74 L/m<sup>2</sup>.h, 80 L/m<sup>2</sup>.h e 20 L/m<sup>2</sup>.h nos processos de ultrafiltração com membranas de 100 kDa, 50 kDa e 20 kDa, respectivamente. A incrustação formada nos processos de filtração apresentou-se majoritariamente de natureza reversível, podendo ser removida por processos de limpeza para reutilização posterior das membranas.

## 6 CONCLUSÃO

Dois fungos do gênero *Aspergillus* apresentaram potencial para produção de lipases com atividade de esterificação a partir de farelo de soja e casca de soja por fermentação em estado sólido: *A. niger* O-4 e *A. fumigatus*, com valores de 365 U/g e 183 U/g, respectivamente. A especificidade das lipases produzidas foi maior para os ácidos butírico e oleico, não havendo esterificação com o ácido láurico.

O fungo *A. niger* O-4 produziu lipases com atividade de hidrólise de até 26 U/g a partir de fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo e casca de arroz. A atividade enzimática foi superior utilizando óleo de soja a 2 % como indutor e 65 % de umidade no meio de cultivo. A determinação da atividade de hidrólise das lipases produzidas foi padronizada a partir de método titulométrico, tendo como meio reacional uma emulsão de azeite de oliva e solução de goma arábica 7 % na proporção de 1:3.

A combinação de processos sequenciais de separação por membranas, utilizando um módulo de filtração tangencial com membranas de microfiltração (20  $\mu\text{m}$  e 0,45  $\mu\text{m}$ ) e de ultrafiltração (100 kDa, 50 kDa e 20 kDa) levou à obtenção de concentrados enzimáticos com atividade de hidrólise 3 vezes superior e com atividade de esterificação 1,7 vez superior ao extrato inicial. Os fluxos permeados dos processos de microfiltração e de ultrafiltração foram superiores a 20 L/m<sup>2</sup>.h, e a incrustação formada apresentou uma natureza reversível.

Os resultados relativos à produção de lipases de *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais são promissores, evidenciando a sua viabilidade e indicando que são necessários estudos complementares a fim de utilizar as enzimas em aplicações industriais específicas e de otimizar as suas condições de separação e concentração por filtração tangencial.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

De forma a continuar os estudos de produção de lipases utilizando resíduos agroindustriais e subsequente separação, os seguintes temas são sugeridos para trabalhos futuros:

- a) Identificação e caracterização molecular das lipases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger* O-4 por fermentação em estado sólido;
- b) Aumento de escala da produção de lipases fúngicas por fermentação em estado sólido utilizando tambor rotativo;
- c) Aplicação em processos industriais das lipases fúngicas produzidas;
- d) Aumento de escala do processo de filtração das lipases, utilizando módulos-piloto equipados com membranas de diferentes configurações e materiais;
- e) Avaliação do efeito da vazão de alimentação, da pressão transmembrana e da temperatura sobre a atividade enzimática durante o processo de separação por membranas;
- f) Estudo de diferentes métodos de limpeza das membranas com agentes físicos e químicos após a concentração das enzimas;
- g) Modelagem matemática do fluxo permeado dos extratos enzimáticos através da aplicação de diferentes modelos de colmatação das membranas.

## 8 REFERÊNCIAS

- ABDELRASOUL, A.; DOAN; H.; LOHI, A. **Fouling in membrane filtration and remediation methods**. In: NAKAJIMA, H. Mass transfer – Advances in sustainable energy and environment oriented numerical modeling. InTech, cap. 4, ISBN: 978-953-51-1170-2, DOI: 10.5772/52370, 2013, 24 p.
- AGUIAR, R. O.; MONDARDO, R. M.; AGNES, E. J.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B. Avaliação e comparação da eficiência de imobilização de lipase pancreática em quitosana para produção de ácidos graxos em frascos agitados. **Acta Scientiarum Technology**, v. 32, p. 15-19, 2010.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; SOUZA, S. L.; LANGONE, M. A. P. Estudo do comportamento da lipase comercial Lipozyme RM IM em reações de esterificação para obtenção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, p. 646-650, 2013.
- ALMEIDA, A. F.; TAULK-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by a new isolated *Candida viswanathii* strain. **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 1225-1234, 2013.
- ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1185-1194, 2009.
- ARAHMAN, N.; ARIFIN, B.; MULYATI, S.; OHMUKAI, Y.; MATSUYAMA, H. Structure change of polyethersulfone hollow fiber membrane modified with pluronic F127, polyvinylpyrrolidone, and tetronic 1307. **Materials Sciences and Applications**, v. 3, p. 72-77, 2012.
- ARAVINDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. Lipase applications in food industry. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 141-158, 2007.
- ARGÜELLO, M. A.; ÁLVAREZ, S.; RIERA, F. A.; ÁLVAREZ, R. Enzymatic cleaning of inorganic ultrafiltration membranes used for whey protein fractionation. **Journal of Membrane Science**, v. 216, p. 121-134, 2003.

- BACCHIN, P.; AIMAR, P.; FIELD, R. W. Critical and sustainable fluxes: theory, experiments and applications. **Journal of Membrane Science**, v. 281, p. 42-69, 2006.
- BAI, S.; AZIZ, S.; KHODADADI, M.; MITRI, C. B.; ST-LOUIS, R.; KERMASHA, S. Lipase-catalyzed synthesis of medium-long-medium type structured lipids using tricaprylin and trilinolenin as substrate models. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, p. 377-389, 2013.
- BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: an overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 9-14, 2010.
- BARBOSA, C. R. **Avaliação do glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como substrato para produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2009.
- BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 881-896, 2003.
- BEZBRADICA, D.; KARALAZIC, I.; OGNJANOVIC, N.; MIJIN, D.; SILER-MARINKOVIC, S.; KNEZEVIC, Z. Studies on the specificity of *Candida rugosa* lipase catalyzed esterification reactions in organic media. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 71, p. 31-41, 2006.
- BHADOURIA, A. S.; SORCI, M.; GU, M.; BELFORT, G.; HAHN, J. Optimization of membrane separation processes for protein fractionation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, p. 5103-5109, 2014.
- BHARTI, M. K.; KHOKHAR, D.; PANDEY, A. K.; GAUR, A. K. Purification and characterization of lipase from *Aspergillus japonicus*: a potent enzyme for biodiesel production. **National Academy Science Letters**, v. 36, p. 151-156, 2013.
- BINOD, P.; PALKHIWALA, P.; GAIKAIWARI, R.; NAMPOOTHIRI, K. M.; DUGGAL, A.; DEY, K.; PANDEY, A. Industrial enzymes – Present status and future perspectives for India. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 72, p. 271-286, 2013.

- BOLTON, G.; LACASSE, D.; KURIYEL, R. Combined models of membrane fouling: Development and application to microfiltration and ultrafiltration of biological fluids. **Journal of Membrane Science**, v. 277, p. 75-84, 2006.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRIÃO, V. B.; TAVARES, C. R. G. Pore blocking mechanism for the recovery of milk solids from dairy wastewater by ultrafiltration. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, p. 393-407, 2012.
- BRIÃO, V. B.; TAVARES, C. R. G. Ultrafiltração como processo de tratamento para o reúso de efluentes de laticínios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, p. 134-138, 2007.
- BROOKS, A. A.; ASAMUDO, N. U. Lipase production by strains of *Aspergillus* species isolated from contaminated body creams. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 3, p. 311-316, 2011.
- BURKERT, J. F. M.; MALDONADO, R. R.; MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M. I. Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p. 61-67, 2005.
- BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 77-84, 2004.
- CARDENAS, F.; CASTRO, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V.; VALMASEDA, M.; ELSON, S. W.; ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 145-154, 2001.
- CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, p. 75-80, 2003.

- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- CASTRO, S. M.; CASTRO, A. M. Assessment of the Brazilian potential for the production of enzymes for biofuels from agroindustrial materials. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 2, p. 87-107, 2012.
- CAUSSERAND, C.; PIERRE, G.; RAPENNE, S.; SCHROTTER, J.; SAUVADE, P.; LORAIN, O. Characterization of ultrafiltration membranes by tracer's retention: comparison of methods sensitivity and reproducibility. **Desalination**, v. 250, p. 767-772, 2010.
- CAVALCANTI, E. A. C.; GUTARRA, M. L. E.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R.; SANT'ANNA JÚNIOR, G. L. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 79-84, 2005.
- CEN – European Committee for Standardization. European Standard EN 14103:2011. Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME). Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. Brussels, 2011.
- CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; LOHA, V.; TIA, S.; BUNNAG, B. Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7159-7164, 2011.
- CHAKRABORTY, K.; VIJAYAGOPAL, P.; CHAKRABORTY, R. D.; VIJAYAN, K. K. Preparation of eicosapentaenoic acid concentrates from sardine oil by *Bacillus circulans* lipase. **Food Chemistry**, v. 120, p. 433-442, 2010.
- CHERIF, S.; MNIF, S.; HADRICHE, F.; ABDELKAFI, S.; SAYADI, S. A newly high alkaline lipase: an ideal choice for application in detergent formulations. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, p. 221-228, 2011.
- COLLA, L. M. **Otimização da produção biotecnológica de lipases e correlação com a produção de biossurfactantes**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande/RS, 2009.

- COLLA, L. M.; FICANHA, A. M. M.; RIZZARDI, J.; BERTOLIN, T. E.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Production and characterization of lipases by two new isolates of *Aspergillus* through solid-state and submerged fermentation. **BioMed Research International**, Article ID 725959, p. 1-9, 2014.
- COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, p. 1-14, 2012.
- COLLA, L. M.; REZZADORI, K.; CÂMARA, S. K.; DEBON, J.; TIBOLLA, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. A solid-state bioprocess for selecting lipase-producing filamentous fungi. **Zeitschrift für Naturforschung, C: Journal of Biosciences**, v. 64, p. 131-137, 2009.
- COLLA, L. M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocess. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8308-8314, 2010.
- CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B.; MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M. G.; CARVALHO, P. O. *Aspergillus* sp. Lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 163-171, 2010.
- CORADI, G. V.; VISITAÇÃO, V. L.; LIMA, E. A.; SAITO, L. Y. T.; PALMIERI, D. A.; TAKITA, M. A.; OLIVA NETO, P.; LIMA, V. M. G. Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 533-540, 2013.
- CORDOVA, J.; MEMMAOUI, M.; ISMAILI-ALAOUI, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 5, p. 75-78, 1998.
- COSTA, J. B.; ROSSI, D. M.; SOUZA, E. A.; SAMIOS, D.; BREGALDA, F.; PERALBA, M. C. R.; FLORES, S. H.; AYUB, M. A. Z. The optimization of biohydrogen production by bacteria using residual glycerol from biodiesel synthesis. **Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 46, p. 1461-1468, 2011.

- COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2006.
- D'ANNIBALE, A., SERMANNI, G. G., FEDERICI, F., PETRUCCIOLI, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1828-1833, 2006.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.
- DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon source on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 657-663, 2000.
- DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M. A.; FREITAS, S. C.; FREIRE, D. M. G.; LAGO, R. C. A.; COUR, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 676-681, 2008.
- DI LUCCIO, M.; CAPRA, F.; RIBEIRO, N. P.; VARGAS, G. D. L. P.; FREIRE, D. M. G.; OLIVEIRA, D. Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113, p. 173-180, 2004.
- DIZGE, N.; KESKINLER, B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 1274-1278, 2008.
- DORS, G.; MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F.; FURIGO JR., A. Simultaneous enzymatic hydrolysis and anaerobic biodegradation of lipid-rich wastewater from poultry industry. **Applied Water Science**, v. 3, p. 343-349, 2013.
- DUPUIS, C.; CORRE, C.; BOYAVAL, P. Lipase and esterase activities of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 4004-4009, 1993.
- DUTRA, J. C. V.; TERZI, S. C.; BEVILAQUA, J. V.; DAMASO, M. C. T.; COURI, S.; LANGONE, M. A. P.; SENNA, L. F. Lipase production in solid-state fermentation

- monitoring biomass growth of *Aspergillus niger* using digital image processing. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 147, p. 63-75, 2008.
- ELIBOL, M.; OZER, D. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 367-372, 2002.
- ELLAIHAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; THAER TALEB, A.; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 525-528, 2004.
- FACCIO, C. **Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim/RS, 2004.
- FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2007.
- FERNÁNDEZ-LORENTE, G. ORTIZ, C.; SEGURA, R. L.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M.; PALOMO, J. M. Purification of different lipases from *Aspergillus niger* by using a highly selective adsorption on hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 92, p. 773-779, 2005.
- FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, v. 28, p. 19-23, 2005.
- FIELD, R. **Fundamentals of fouling**. In: PEINEMANN, K.; NUNES, S. P. Membranes for water treatment. Weinheim: Wiley, v. 4, cap. 4, ISBN: 978-3-527-31483-6, 2010, 24 p.
- FROEHLER, S.; LEITHOLD, J.; LIMA JR., L. F. Transesterificação de óleos vegetais: caracterização por cromatografia em camada delgada e densidade. **Química Nova**, v. 30, p. 2016-2019, 2007.
- GHORAI, M. K.; SHUKLA, D.; BHATTACHARYYA, A. Syntheses of chiral  $\beta$ - and  $\gamma$ -amino ethers, morpholines, and their homologues via nucleophilic ring-opening of

- chiral activated aziridines and azetidines. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, p. 3740-3753, 2012.
- GHORAI, S.; BANIK, S. P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. Fungal biotechnology in food and feed processing. **Food Research International**, v. 42, p. 577-587, 2009.
- GOLUNSKI, S.; ASTOLFI, V.; CARNIEL, N.; OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; TREICHEL, H. Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. **Separation and Purification Technology**, v. 78, p. 261-265, 2011.
- GOTTSCHALK; L. M. F.; BON, E. P. S.; NOBREGA, R. Lignin peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T7A: enzyme concentration using ultrafiltration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 147, p. 23-32, 2008.
- GRIEBELER, N.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; CECHET, J. L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; RIGO, E.; NINOW, J. L. Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, p. 578-586, 2011.
- GULATI, R.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. Fermentation and downstream processing of lipase from *Aspergillus terreus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 149-155, 2000.
- GUTARRA, M. L. E. **Produção de lipase por fermentação no estado sólido: Seleção de fungos protetores e estudo das condições de cultivo**. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, 2003.
- HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de separação por membranas**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2006, 180 p.
- HABULIN, M.; SABEDER, S.; PALJEVAC, M.; PRIMOZIC, M.; KNEZ, Z. Lipase-catalyzed esterification of citronellol with lauric acid in super critical carbon dioxide/co-solvent media. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, p. 199-203, 2007.

- HAQ, I.; IDREES, S.; RAJOKA, M. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 637-341, 2002.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.
- HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications: an overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, p. 155-170, 2004.
- HUISMAN, I. H.; PRÁDANOS, P.; HERNÁNDEZ, A. The effect of protein-protein and protein-membrane interactions on membrane fouling in ultrafiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 179, p. 79-90, 2000.
- HWANG, K.; CHIANG, Y. Comparisons of membrane fouling and separation efficiency in protein/polysaccharide cross-flow microfiltration using membranes with different morphologies. **Separation and Purification Technology**, v. 125, p. 74-82, 2014.
- IANNI, M.; MOO-YOUNG, M. Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1271-1278, 2002.
- IFTIKHAR, T.; NIAZ, M.; JABEEN, R.; HAQ, I. U. Purification and characterization of extracellular lipases. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, p. 1541-1545, 2011.
- IRFAN, M.; IDRIS, A.; YUSOF, N. M.; KHAIRUDDIN, N. F. M.; AKHMAL, H. Surface modification and performance enhancement of nano-hybrid f-MWCNT/PVP90/PES hemodialysis membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 467, p. 73-84, 2014.
- ISLAM, M. A.; PARVEEN, F.; HOSSAIN, K.; KHATUN, S.; KARIM, M. R.; KIM, G. S.; ABSAR, N.; HAQUE, M. S. Purification and biochemical characterization of lipases from the dorsal part of *Cirrhinus reba*. **Thai Journal of Agricultural Science**, v. 42, p. 71-80, 2009.
- IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization – aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1019-1032, 2008.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 555-569, 2012.

- KIM, H. J.; YOUN, S. H.; SHIN, C. S. Lipase-catalyzed synthesis of sorbitol-fatty acid esters at extremely high substrate concentrations. **Journal of Biotechnology**, v. 123, P. 174-184, 2006.
- KITTIKUN, A. H.; KAEWTHONG, W.; CHEIRSILP, B. Continuous production of monoacylglycerols from palm olein in packed-bed reactor with immobilized lipase PS. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 116-120, 2008.
- KRSTIC, D. M.; ANTOV, M. G.; PERICIN, D. M.; HÖFLINGER, W.; TEKIC, M. N. The possibility for improvement of ceramic membrane ultrafiltration of an enzyme solution. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, p. 10-15, 2007.
- KUSDIANA, D.; SAKA, S. Methyl esterification of free fatty acids of rapeseed oil as treated in supercritical methanol. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 34, p. 383-387, 2001.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LI, Q.; BI, Q.; LIN, H.; BIAN, L.; WANG, X. A novel ultrafiltration (UF) membrane with controllable selectivity for protein separation. **Journal of Membrane Science**, v. 427, p. 155-167, 2013.
- LIN, E. S.; WANG, C. C.; SUNG, S. C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 98-102, 2006.
- LOPES, D. B.; FRAGA, L. P.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Lipase and esterase – to what extent can this classification be applied accurately? **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 608-613, 2011.
- LOPES, F. L. G.; SEVERO JÚNIOR, J. B.; SOUZA, R. R.; EHRHARDT, D. D.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Concentration by membrane separation processes of a medicinal product obtained from pineapple pulp. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 457-464, 2009.

- LÓPEZ, E.; DEIVE, F. J.; LONGO, M. A.; SANROMÁN, M. A. Strategies for utilisation of food-processing wastes to produce lipases in solid-state cultures of *Rhizopus oryzae*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, p. 929-935, 2010.
- MACARIO, A.; GIORDANO, G. Catalytic conversion of renewable sources for biodiesel production: a comparison between biocatalysts and inorganic. **Catalysis Letters**, v. 143, p. 159-168, 2013.
- MALDONADO, R. R.; BURKERT, J. F. M.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Evaluation of lipase production by *Geotrichum candidum* in shaken flasks and bench-scale stirred bioreactor using different impellers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 147-151, 2012.
- MARELLA, C.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; METZGER, L. E. Application of membrane separation technology for developing novel dairy food ingredients. **Food Processing & Technology**, v. 4, p. 1-5, 2013.
- MEHTA, A.; ZYDNEY, A. L. Permeability and selectivity analysis for ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 249, p. 245-249, 2005.
- MELLO, B. C. B. S.; PETRUS, J. C. C.; HUBINGER, M. D. Desempenho do processo de concentração de extratos de própolis por nanofiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 166-172, 2010.
- MENDES, A. A; CASTRO, H. F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.
- MENONCIN, S.; DOMINGUES, 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 Bioprocess Technology**, v. 3, p. 537-544, 2010.
- MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: Produção propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 62, p. 213-234, 2011.

- MIERZWA, J. C.; SILVA, M. C. C.; RODRIGUES, L. D. B.; HESPANHOL, I. Tratamento de água para abastecimento público por ultrafiltração: avaliação comparativa através dos custos diretos de implantação e operação com os sistemas convencional e convencional com carvão ativado. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 13, p. 78-87, 2008.
- MITIDIERI, S.; MARTINELLI, A. H. S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with comercial detergent formulations. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1217-1224, 2006.
- MOHANTY, K; PURKAIT, M. K. **Membrane technologies and applications**. Boca Raton: CRC Press. 2012, 503 p.
- MONDAL, S.; DE, S. A fouling model for steady state crossflow membrane filtration considering sequential intermediate pore blocking and cake formation. **Separation and Purification Technology**, v. 75, p. 222-228, 2010.
- MOZIA, S.; DAROWNA, D.; ORECKI, A.; WRÓBEL, R.; WILISZEWSKA, K.; MORAWSKI, A. W. Microscopic studies on TiO<sub>2</sub> fouling of MF/UF polyethersulfone membranes in a photocatalytic membrane reactor. **Journal of Membrane Science**, v. 470, p. 356-368, 2014.
- MULDER, M. **Basic principles of membrane technology**. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 2. ed., 1996, 594 p.
- MUÑOZ, P. A.; CORREA-LLANTÉN, D. N.; BLAMEY, J. M. Production, purification and partial characterization of four lipases from a thermophile isolated from Deception Island. **Lipids**, v. 48, p. 527-533, 2013.
- NAGARAJAN, S. New tools for exploring “old friends – microbial lipases”. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 1163-1196, 2012.
- NAIK, S.; BASU, A.; SAIKIA, R.; MADAN, B.; PAUL, P.; CHATERJEE, R.; BRASK, J.; SVENDSEN, A. Lipases for use in industrial biocatalysis: Specificity of selected structural groups of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p. 18-23, 2010.

- NIGAM, M. O.; BANSAL, B.; CHEN, X. D. Fouling and cleaning of whey protein concentrate fouled ultrafiltration membranes. **Desalination**, v. 218, p. 313-322, 2008.
- OLIVEIRA, B. H.; CORADI, G. V.; ATTILI-ANGELIS, D.; SCAURI, C.; LUQUES, A. H. P. G.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; OLIVA NETO, P.; LIMA, V. M. G. Comparison of lipase production on crambe oil and meal by *Fusarium* sp. (*Gibberella fujikuroi* complex). **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 115, p. 1413-1425, 2013.
- OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; FACCIO, C.; ROSA, C. D.; BENDER, J. P.; LIPKE, N.; AMROGINSKI, C.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. Optimization of alkaline transesterification of soybean oil and castor oil for biodiesel production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 553-560, 2005.
- ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, p. 97-109, 2012.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I – Bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.
- PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 135-140, 2003.
- PAULA, A. V.; BARBOZA, J. C. S.; CASTRO, H. F. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. **Química Nova**, v. 28, p. 792-796, 2005.

- PEEVA, P. D.; KNOCHE, T.; PIEPER, T.; ULBRICHT, M. Cross-flow ultrafiltration of protein solutions through unmodified and surface functionalized polyethersulfone membranes – Effect of process conditions on separation performance. **Separation and Purification Technology**, v. 92, p. 83-92, 2012.
- PEREIRA JÚNIOR, N.; BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de bioprocessos**. Séries em Biotecnologia, v. 1. Rio de Janeiro: Escola de Química, 2008.
- PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 833-841, 2002.
- PIETROBON, C. V. **Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 2008.
- PILISSÃO, C.; CARVALHO, P. O.; NASCIMENTO, M. G. The influence of conventional heating and microwave irradiation on the resolution of (RS)-*sec*-butylamine catalyzed by free or immobilized lipases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1688-1697, 2012.
- PINHEIRO, T. L. F. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim/RS, 2006.
- PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 67-80, 1998.
- POLETO, P.; DUARTE, J.; LUNKES, M. S.; SANTOS, V.; ZENI, M.; MEIRELES, C. S.; FILHO, G. R.; BOTTINO, A. Avaliação das características de transporte em membranas de poliamida 66 preparadas com diferentes solventes. **Polímeros**, v. 22, p. 273-277, 2012.
- PREDABON, S. M. **Produção e caracterização parcial de lipase produzida por *Penicillium brevicompactum* em biorreator de leito fixo utilizando resíduos**

- agroindustriais como substrato.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim/RS, 2011.
- RADZI, S. M.; MUSTAFA, W. A. F.; OTHMAN, S. S.; NOOR, H. M. Green synthesis of butyl acetate, a pineapple flavour via lipases catalyzed reaction. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 59, p. 677-680, 2011.
- RAJAN, A.; NAIR, A. J. A comparative study on alkaline lipase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* MTCC 9657 in submerged and solid-state fermentation using economically and industrially feasible substrate. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, p. 569-574, 2011.
- RAJESH, S.; MURTHY, Z. V. P. Ultrafiltration membranes from waste polyethylene terephthalate and additives: synthesis and characterization. **Química Nova**, v. 37, p. 653-657, 2014.
- RAMOS-OLMOS, R.; ROGEL-HERNÁNDEZ, E.; FLORES-LÓPEZ, L.; LIN, S. W.; ESPINOZA-GÓMEZ, H. Synthesis and characterization of asymmetric ultrafiltration membrane made with recycled polystyrene foam and diferente additives. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 53, p. 1705-1708, 2008.
- RAZZAGHI, M. H.; SAFEKORDI, A.; TAVAKOLMOGHADAM, M.; REKABDAR, F.; HEMMATI, M. Morphological and separation performance study of PVDF/CA blend membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 470, p. 547-557, 2014.
- REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. 1. ed., v. 3. Pelotas: Editora Universitária, 2000.
- REINEHR, C. O.; RIZZARDI, J.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Química Nova**, v. 37, p. 454-460, 2014.
- RIGO, E.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; MENONCIN, S.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; KALIL, S. J.; NINOW, J. L.; DI LUCCIO, M. Esterification activity of novel fungal and yeast lipases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1881-1888, 2010.

- RIGO, E.; NINOW, J. L.; TSAI, S. M.; DURRER, A.; FOLTRAN, L. L.; REMONATTO, D.; SYCHOSKI, M.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M. Preliminary characterization of novel extra-cellular lipase from *Penicillium crustosum* under solid-state fermentation and its potential application for triglycerides hydrolysis. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1592-1600, 2012.
- RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de biodiesel: Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Biociência**, v. 37, p. 44-51, 2010.
- RIZZARDI, J. **Produção de lipases fúngicas visando catálise de reações de síntese**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim/RS, 2012.
- RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D. E.; PARADA, J. L.; MEDEIROS, A. B. P.; CARVALHO, J. C.; LACERDA, L. G.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; SOCCOL, C. R. Concentration by ultrafiltration and stabilization of phytase produced by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 374-379, 2013.
- ROSAS, I.; COLLADO, S.; GUTIÉRREZ, A.; DÍAZ, M. Fouling mechanisms of *Pseudomonas putida* on PES microfiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 465, p. 27-33, 2014.
- ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em eluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 126-131, 2010.
- SÁ, I. S.; CABRAL, L. M. C.; MATTA, V. M. Concentração de suco de abacaxi através dos processos com membranas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, p. 53-62, 2003.
- SABEDER, S.; HABULIN, M.; KNEZ, Z. Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 880-886, 2006.
- SALAH, R. B.; GHAMGHUI, H.; MILED, N. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, p. 368-372, 2007.

- SAXENA, A.; TRIPATHI, B. P.; KUMAR, M.; SHAHI, V. K. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: an overview. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, p. 1-22, 2009.
- SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 1-18, 2003.
- SCHMIDELL, W.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001.
- SETHI, B. K.; ROUT, J. R.; DAS, R.; NANDA, P. K.; SAHOO, S. L. Lipase production by *Aspergillus terreus* using mustard seed oil cake as a carbon source. **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 241-252, 2013.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BENERJEE, U. C. Production, purification characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.
- SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Performance of ultrafiltration membranes in ethanol-water solutions: effect of membrane conditioning. **Journal of Membrane Science**, v. 198, p. 75-85, 2002.
- 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**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim/RS, 2010.
- SILVA, M. F.; FREIRE, D. M. G.; CASTRO, A. M.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 145-152, 2011.
- SILVA, M. F.; FREIRE, D. M. G.; CASTRO, A. M.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Concentration, partial characterization and immobilization of lipase extract from *P. brevicompactum* by solid-state fermentation of babassu cake and castor bean cake. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, p. 755-766, 2011.

- SILVA, V. C. F.; CONTESINI, F. J.; CARVALHO, P. O. Characterization and catalytic activity of free and immobilized lipase from *Aspergillus niger*: a comparative study. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 1468-1474, 2008.
- SILVEIRA, C. M.; FURLONG, E. B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 805-811, 2007.
- SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 486–520, 2012.
- SKORONSKI, E.; JOÃO, J. J.; CECHINEL, M. A. P.; FERNANDES, M. Otimização da esterificação de ácido hexanóico com n-butanol empregando lipase (*Termomyces lanuginosus*) imobilizada em gelatina. **Química Nova**, v. 36, p. 364-367, 2013.
- SMANIOTTO, A.; SKOVRONSKI, A.; RIGO, E.; TSAI, S. M.; DURRER, A.; FOLTRAN, L. L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. “Synthetic lipase” production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1490-1498, 2012.
- SONG, L. Flux decline in crossflow microfiltration and ultrafiltration: mechanisms and modeling of membrane fouling. **Journal of Membrane Science**, v. 139, p. 183-200, 1998.
- STRATHMANN, H. Membrane separation processes: current relevance and future opportunities. **AIChE Journal**, v. 47, p. 1077-1087, 2001.
- STRATHMANN, H.; GIORNO, L.; DRIOLI, E. **An introduction to membrane science and technology**. Roma: Consiglio Nazionale delle Ricerche, 2006, 394 p.
- SUN, S. Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2607-2612, 2009.
- SUSANTO, H. **Fouling study in ultrafiltration: mechanism and control via membrane surface modification**. Thesis (Doctorate in Natural Sciences). University of Duisburg-Essen, Essen, Germany, 2007.

- SZÉLPÁL, S.; POSER, O.; ÁBEL, M. Enzyme recovery by membrane separation method from waste products of the food industry. **Acta Technica Corviniensis**, v. 6, p. 149-154, 2013.
- SZTAJER, H.; BRYJAK, W. M. Capillar membranes for purification of *Pseudomonas fluorescens* lipase. **Bioprocess Engineering**, v. 4, p. 257-259, 1989.
- TAVARES, L. L. P.; NASCIMENTO, A. E.; OKADA, K.; SILVA, C. A. A. Seleção de diferentes meios para produção de lipase a partir de *Bacillus licheniformis* (UCP 1014). **Exacta**, v. 9, p. 309-316, 2011.
- THAKUR, A.; KUMAR, A.; KANWAR, S. S. Production of n-propyl cinnamate (musty vine amber flavor) by lipase catalysis in a non-aqueous medium. **Current Biotechnology**, v. 1, p. 234-240, 2012.
- TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, V. J. A review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 182-196, 2010.
- TRES, M. V.; FERRAZ, H. C.; DALLAGO, R. M.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. Characterization of polymeric membranes used in vegetable oil/organic solvents separation. **Journal of Membrane Science**, v. 362, p. 495-500, 2010.
- TRES, M. V.; NOBREGA, R.; CARVALHO, R. B.; OLIVEIRA, J. V.; DI LUCCIO, M. Solvent recovery from soybean oil/n-hexane mixtures using hollow fiber membrane. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, p. 577-584, 2012.
- TRES, M. V.; RACOSKI, J. C.; NOBREGA, R.; CARVALHO, R. B.; OLIVEIRA, J. V.; DI LUCCIO, M. Solvent recovery from soybean oil/n-butane mixtures using a hollow fiber ultrafiltration membrane. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, p. 243-249, 2014.
- UNIVERSIDADE DE COIMBRA. Portal Laboratórios Virtuais de Processos Químicos. Processos Químicos. Membranas. Disponível em: <<http://labvirtual.eq.uc.pt>> Acesso em: 30 maio 2014.

- VAIDYA, A.; GERA, G.; RAMAKRISHNA, A. Evaluation and optimization of immobilized lipase for esterification of fatty acid and monohydric alcohol. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 2987-2995, 2008.
- VALIÑO, V.; ROMÁN, M. F. S.; IBAÑEZ, R.; ORTIZ, I. Improved separation of bovine serum albumin and lactoferrin mixtures using charged ultrafiltration membranes. **Separation and Purification Technology**, v. 125, p. 163-169, 2014.
- VARDANEGA, R.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; POLLONI, A.; RIGO, E.; NINOW, J. L.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M. A systematic study on extraction of lipase obtained by solid-state fermentation of soybean meal by a newly isolated strain of *Penicillium* sp. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 461-465, 2010.
- VARDANEGA, R.; TRES, M. V.; MAZUTTI, M. A.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. Effect of magnetic field on the ultrafiltration of bovine serum albumin. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 1087-1093, 2013.
- VARGAS, G. D. L. P.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; BENETI, S. C.; FREIRE, D. M. G.; DI LUCCIO, M. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 47-54, 2008.
- VENTURA, S. P. M.; SOUSA, S. G.; FREIRE, M. G.; SERAFIM, L. S.; LIMA, A. S.; COUTINHO, J. A. P. Design of ionic liquids for lipase purification. **Journal of Chromatography B – Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, p. 2679-2687, 2011.
- VERMA, M. L.; BARROW, C. J.; PURI, M. Nanobiotechnology as a novel paradigm for enzyme immobilisation and stabilisation with potential applications in biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 23-39, 2013.
- WANG, Y.; TANG, C. Y. Protein fouling of nanofiltration, reverse osmosis, and ultrafiltration membranes – The role of hydrodynamic conditions, solution chemistry, and membrane properties. **Journal of Membrane Science**, v. 376, p. 275-282, 2011.
- WGM. **Manual do sistema portátil de filtração tangencial**. WGM Equipamentos de Importação e Exportação. São Paulo, 2012, 22 p.

- WOLSKI, E.; MENUSSI, E.; REMONATTO, D.; VARDANEGA, R.; ARBTER, F.; RIGO, E.; NINOW, J.; MAZUTTI, M. A.; 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**, v. 42, p. 1557-1560, 2009.
- WOLSKI, E.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Production and partial characterization of lipases from a newly isolated *Penicillium* sp. using experimental design. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 60-66, 2009.
- WYART, Y.; GEORGES, G.; DEUMIÉ, C.; AMRA, C.; MOULIN, P. Membrane characterization by microscopic methods: Multiscale structure. **Journal of Membrane Science**, v. 315, p. 82-92, 2008.
- XIE, W.; WANG, J. Enzymatic production of biodiesel from soybean oil by using immobilized lipase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/poly(styrene-methacrylic acid) magnetic microsphere as a biocatalyst. **Energy & Fuels**, v. 28, p. 2624-2631, 2014.
- YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 438-450, 1998.
- ZAIDI, A.; GAINER, J. L.; CARTA, G.; MRANI, A.; KADIRI, T.; BELARBI, Y.; MIR, A. Esterification of fatty acids using nylon-immobilized lipase in n-hexane: kinetic parameters and chain-length effects. **Journal of Biotechnology**, v. 93, p. 209-216, 2002.
- ZURIAGA-AGUSTÍ, E.; ALVENTOSA-DELARA, E.; BARREDO-DAMAS, S.; ALCAINA-MIRANDA, M. I.; IBORRA-CLAR, M. I.; MENDOZA-ROCA, J. A. Performance of ceramic ultrafiltration membranes and fouling behavior of a dye-polysaccharide binary system. **Water Research**, v. 54, p. 199-210. 2014.

## **9 APÊNDICE**

– APÊNDICE A –

ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA  
**QUÍMICA NOVA (v. 37, p. 454-460, 2014)**

**PRODUÇÃO DE LIPASES DE *Aspergillus niger* E *Aspergillus fumigatus* ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO, AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO SUBSTRATO E SEU USO EM REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO E ALCOÓLISE****Christian Oliveira Reinehr<sup>a</sup>, Juliana Rizzardi<sup>a</sup>, Marcell Fernandes Silva<sup>a</sup>, Débora de Oliveira<sup>a</sup>, Helen Treichel<sup>b</sup> e Luciane Maria Colla<sup>\*c</sup>**<sup>a</sup>Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Av. Sete de Setembro, 1621, 99700-000 Erechim – RS, Brasil<sup>b</sup>Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus de Erechim, Av. Dom João Hoffmann, 313, 99700-000 Erechim – RS, Brasil<sup>c</sup>Universidade de Passo Fundo, BR 285, Bairro São José, 99052-900 Passo Fundo – RS, Brasil

Recebido em 11/07/2013; aceito em 14/11/2013; publicado na web em 10/02/2014

PRODUCTION OF LIPASES WITH *Aspergillus niger* AND *Aspergillus fumigatus* THROUGH SOLID STATE FERMENTATION: EVALUATION OF SUBSTRATE SPECIFICITY AND USE IN ESTERIFICATION AND ALCOHOLYSIS REACTIONS. Filamentous fungi were cultured under solid state fermentation of soybean residues to produce lipases. Enzymes produced by *Aspergillus niger* esterified oleic and butyric acids in the presence of ethanol, while enzymes produced by *Aspergillus fumigatus* demonstrated no esterification activity toward lauric acid. In case of *A. niger*, direct lyophilization of fermented bran led to higher esterification activity. The esterification of oleic acid by enzymes of *A. fumigatus* was neither influenced by pH adjustment nor by the extraction process. Conversions to ethyl esters were higher after pH adjustment with lyophilized liquid extract of *A. niger*.

Keywords: lipase; specificity; esterification.

**INTRODUÇÃO**

O mercado industrial de aplicação de enzimas continua a crescer devido ao desenvolvimento de novas tecnologias, ao uso da engenharia genética durante a produção e à emergência de novos campos de aplicação.<sup>1</sup> Dentre as enzimas, as lipases são muito utilizadas. Lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas que podem catalisar reações de hidrólise parcial ou total de triacilgliceróis em ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis, atuando também em reações de esterificação, interesterificação e transesterificação, quando em ambiente com restrição de água.<sup>2,3</sup>

Lipases são aplicáveis a diversos setores, como as indústrias de tecidos, detergentes, polpa e papel, gorduras, óleos, tratamento de efluentes, polímeros biodegradáveis, fármacos, testes de diagnóstico, cosméticos, chás, aplicações médicas, biossensores, couro, alimentos e biodiesel, como revisado por Singh e Mukhopadhyay,<sup>4</sup> Kapoor e Gupta<sup>5</sup> e anteriormente por Contesini *et al.*<sup>6</sup> e Hasan *et al.*<sup>7</sup>

Alguns exemplos podem ser observados nos trabalhos conduzidos por Dors *et al.*,<sup>8</sup> no tratamento de efluentes da indústria de aves; Bai *et al.*<sup>9</sup> e Chakraborty *et al.*<sup>10</sup> na produção de lipídios desenhados; Macario e Giordano<sup>11</sup> na comparação entre biocatalisadores e catalisadores inorgânicos para a produção de biodiesel; Thakur *et al.*<sup>12</sup> e Radzi *et al.*<sup>13</sup> na síntese de aromas utilizando lipases; Pilissão *et al.*<sup>14</sup> na imobilização de lipases e uso sob irradiação por micro-ondas; Silva *et al.*<sup>15</sup> na imobilização de lipases por adsorção em Celite.

Enzimas microbianas são preferíveis para aplicações industriais em virtude dos menores tempos de geração para produção, facilidade de manipulações genéticas, aumento de escala e purificação, especificidade e estabilidade.<sup>16</sup> De acordo com Shukla e Gupta,<sup>17</sup> as lipases fúngicas são preferidas em comparação às bacterianas por atuarem em faixas mais amplas de processo, além de serem geralmente produzidas no meio extracelular. A maior utilização industrial dessas enzimas, entretanto, está condicionada à diminuição dos custos de produção. Estratégias para este fim incluem a seleção de novos microrganismos produtores, bem como a utilização de meios de cultivo de baixo

custo. Neste sentido, o uso da fermentação em estado sólido para a produção de lipases fúngicas é apropriado, já que utiliza resíduos agroindustriais na composição dos meios de cultivo.<sup>18,19</sup>

Lipases provenientes de distintas fontes microbianas normalmente apresentam uma ampla faixa de propriedades dependentes da fonte produtora, relacionada ainda com a especificidade posicional, especificidade ao substrato, estabilidade em solventes orgânicos, termoestabilidade, pH ótimo, entre outros.<sup>20</sup>

Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo a seleção de microrganismos produtores de lipases com atividade de esterificação, além do estudo das condições de produção, a determinação da especificidade por diferentes substratos e a aplicação dos extratos enzimáticos liofilizados como catalisadores em reações de síntese de ésteres etílicos de ácidos graxos.

**PARTE EXPERIMENTAL****Microrganismos e preparo do inóculo**

Foram utilizados 16 fungos filamentosos isolados por Colla *et al.*,<sup>21</sup> sendo 1 proveniente do Laboratório de Fermentações da Universidade de Passo Fundo (*Aspergillus fumigatus*), 5 oriundos de solo contaminado com óleo diesel e 10 oriundos de efluente de laticínios, pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Fusarium*.

Dos isolados estudados, o microrganismo que apresentou os melhores resultados nas etapas posteriores foi submetido à identificação genética utilizando a metodologia citada por Smaniotto *et al.*,<sup>22</sup> no Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

Os fungos foram mantidos sob refrigeração em tubos de ensaio contendo ágar batata dextrose (ABD) inclinado, sendo realizada a repicagem das cepas a cada três meses. Para o preparo do inóculo foram adicionados 10 mL de solução de Tween 80 (0,1%) aos tubos de ensaio com ágar, realizando-se a raspagem dos esporos com alça de platina. O inóculo foi preparado adicionando-se 2,5 mL da suspensão

\*e-mail: lmcolla@upf.br

de esporos obtida em erlenmeyers de 1 L contendo 100 mL de ABD, com posterior incubação a 30 °C durante 7 dias. Após o crescimento fúngico na superfície do ágar adicionaram-se 50 mL de Tween 80 (0,1%), seguido de uma raspagem dos esporos e filtração em gaze estéril para retenção das hifas.

### Produção de lipases com atividade de esterificação e avaliação da especificidade por substrato

Os microrganismos mencionados foram utilizados para a seleção de fungos produtores de lipases com atividade de esterificação, uma vez que em estudos anteriores apresentaram-se bons produtores de lipases com atividade de hidrólise.<sup>21</sup> Foram utilizadas nas fermentações em estado sólido as condições de cultivo estudadas por Colla *et al.*,<sup>23</sup> com pequenas modificações. O meio de cultivo utilizado na etapa de seleção de microrganismos foi preparado a partir da mistura de 85% de farelo de soja e 15% de casca de soja. 25 g da mistura foram adicionados em béqueres de polipropileno de 600 mL tampados com manta acrílica hidrofóbica. O meio de cultivo foi autoclavado a 121 °C por 20 min, com posterior ajuste do pH do meio em 4,5 através da adição de uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5 mol/L. A umidade foi ajustada para 60% com água destilada estéril. Aos meios adicionaram-se 2% de óleo de soja como indutor para a produção de lipases. A inoculação foi realizada com a adição de 1 mL da solução de esporos para cada béquer, correspondendo a uma concentração final de esporos de 10<sup>7</sup> esporos/g de substrato. Os experimentos foram incubados em estufa a 30 °C, sendo realizada a coleta das amostras para a determinação das atividades de esterificação nos tempos inicial e após 4 dias de fermentação. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Para a segunda etapa foram selecionadas as cepas que apresentaram maior atividade enzimática. Realizou-se a modificação do meio de produção de lipases, utilizando-se 80% de farelo de soja e 20% de casca de soja, 65% de umidade final e adição de óleo de soja e ureia como indutor e fonte de nitrogênio, respectivamente, na concentração de 1%. Essas modificações foram realizadas com base em estudos conduzidos por Rizzardi.<sup>24</sup>

A partir desta composição de meio foram realizados novos ensaios, com a finalidade de avaliar: a influência do ajuste de pH do meio na produção de lipases, a necessidade da extração das enzimas do farelo fermentado anteriormente à liofilização e a especificidade das lipases produzidas frente a diferentes ácidos graxos (butírico, láurico e oléico), utilizados como substrato na reação de esterificação. As enzimas foram testadas utilizando o processo convencional (extração seguida de liofilização) e realizando-se a liofilização direta do farelo fermentado, a fim de propor-se uma etapa a menos no processo de *downstream* da enzima. Um planejamento fatorial misto 2<sup>2</sup>.3<sup>1</sup> foi conduzido para cada cepa fúngica selecionada na primeira etapa, conforme apresentado na Tabela 1.

### Determinação da atividade de esterificação

Os farelos fermentados foram adicionados de tampão fosfato de sódio 0,100 mol/L e pH 7,0 na razão 1:5 (10 g de meio fermentado para 50 mL de tampão) e incubados em banho termostático a 35 °C por 20 min e agitação de 160 rpm. Após a incubação, as amostras foram filtradas, utilizando-se funil de tecido de nylon e pressão manual para a obtenção do extrato enzimático bruto.<sup>25</sup> Como fase preparatória do procedimento de liofilização, os extratos enzimáticos brutos foram distribuídos em camadas de 1 cm de espessura em placas de Petri e submetidos ao congelamento em liofilizador a -80 °C por 24 h.<sup>26</sup> As amostras secas foram acondicionadas em frascos de vidro, lacrados, codificados e vedados com Parafilm, sendo armazenadas sob refrigeração (4 °C).

A atividade de esterificação foi quantificada através da reação entre ácido graxo e etanol na razão molar de 1:1 (mistura padrão).<sup>27</sup> A reação foi conduzida em erlenmeyers contendo 5 mL da mistura padrão e 0,1 g do farelo fermentado liofilizado (FFL) ou do extrato líquido liofilizado (ELL), após foram incubados em banho a 40 °C por 40 min e agitação de 160 rpm. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata e adicionadas a 20 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para paralisar a reação e para extração do ácido graxo. Após, a quantidade de ácido graxo consumido foi determinada através da titulação com NaOH 0,035 mol/L até atingir o pH 11,0. Os ensaios controles continham 20 mL da solução de acetona-etanol (1:1) e 500 µL da mistura padrão.

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

$$AE = \left[ \frac{(V_b - V_a) \times M \times V_f \times 1000}{t \times m \times V_c} \right] \quad (1)$$

onde: AE = atividade de esterificação (U/g); V<sub>a</sub> = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 min (mL); V<sub>b</sub> = volume de NaOH gasto na titulação da amostra do ensaio controle (mL); M = concentração molar da solução de NaOH (mol/L); V<sub>f</sub> = volume final de meio reacional (mL); t = tempo (min); m = massa do extrato enzimático bruto liofilizado (g); V<sub>c</sub> = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

### Uso das enzimas em reação de alcoólise de óleo vegetal

As enzimas obtidas nas condições determinadas anteriormente foram utilizadas para a reação de esterificação de óleo vegetal. O óleo de soja refinado (Bunge) foi escolhido como substrato a ser utilizado na alcoólise enzimática em solvente orgânico. Álcool etílico (Merck, 99% de pureza) e n-hexano PA (Merck, 99% de pureza) foram utilizados nos experimentos como substrato e solvente orgânico, respectivamente.<sup>28</sup>

Para a reação de alcoólise foram utilizados 1 g de óleo de soja, 40 mL de solvente (n-hexano), 150 mg de etanol (razão molar óleo-álcool de 1:3) e 250 mg de extrato enzimático liofilizado ou farelo fermentado liofilizado. Os erlenmeyers contendo os reagentes foram colocados em agitador rotativo (*shaker*) a 200 rpm por 8 h, após, as amostras foram filtradas em papel filtro e levadas a evaporação do solvente em estufa na temperatura de 65 °C.

Para a determinação da conversão da reação transferiram-se 250 µL da amostra para balão volumétrico de 10 mL completando o volume com n-heptano. Após, transferiu-se uma alíquota de 50 µL desta solução para um balão volumétrico de 1 mL, a fim de obter uma concentração próxima a 1000 mg/L e adicionaram-se 50 µL de padrão interno (heptadecanoato de metila), obtendo-se uma concentração de 250 mg/L, utilizando como solvente n-heptano.

Esta solução (1 µL) foi injetada em duplicata em um cromatógrafo gasoso (CG/FID Shimadzu modelo GC 2010), com detector de ionização de chama equipado com injetor automático AOC-20i e uma coluna capilar RTX-Wax (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm), com as seguintes condições cromatográficas: temperatura inicial da coluna de 120 °C, permanecendo por 1 min nesta condição, aumentando-se a temperatura a uma taxa de 15 °C/min até 180 °C, permanecendo assim por 2 min, e aumentando novamente a uma taxa de 5 °C/min até 250 °C permanecendo 2 min nesta condição. Ar sintético e nitrogênio foram utilizados como gases de arraste e a temperatura do injetor e detector foram de 250 °C e a taxa de split de 1:50.

As amostras referentes a cada experimento foram preparadas em triplicata conforme descrito anteriormente. Utilizou-se a mesma

metodologia de preparo das amostras para análise descrita por Silva.<sup>29</sup> As adaptações, em relação ao método oficial,<sup>30</sup> foram testadas com base na amostra de biodiesel etílico de soja obtido pelo método de catálise alcalina utilizando hidróxido de sódio como catalisador, em condições de reação otimizadas por Faccio.<sup>28</sup> O cálculo do teor de ésteres etílicos da amostra foi obtido através da Equação 2 com base no método.

$$\text{Conversão (\%)} = \left[ \frac{\Sigma A - API}{API} \times \frac{CPI}{C_{\text{amostra}}} \right] \times 100 \quad (2)$$

onde:  $\Sigma A$  = Somatório das áreas correspondentes aos picos dos ésteres (C14:0 a C24:0) e do padrão interno (C17:0 – heptadecanoato de metila); API = Área do padrão interno (C17:0); CPI = Concentração do padrão interno na amostra injetada (mg/L);  $C_{\text{amostra}}$  = Concentração da amostra injetada (mg/L).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Seleção de microrganismos produtores de lipases com atividade de esterificação

Dos 5 fungos isolados de solo contaminado com óleo diesel apenas a cepa O-4 apresentou atividade de esterificação (reação entre ácido graxo e etanol), de  $364,58 \pm 0,30$  U/g. Os fungos isolados de efluente da indústria de laticínios não produziram lipases com atividade de esterificação, enquanto que o fungo *Aspergillus fumigatus* apresentou atividade de esterificação de  $182,92 \pm 0,47$  U/g.

As sequências de bases nitrogenadas da cepa O-4 foram comparadas aos dados (18S rRNA) obtidos no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A cepa foi identificada como *Aspergillus niger* cepa DAOM (100% de identidade, código de acesso no *GenBank*: KC545858.1).

Colla *et al.*<sup>21</sup> estudaram a seleção de fungos filamentosos (a partir de efluente de laticínios e solo contaminado com óleo diesel) produtores de lipases com atividade hidrolítica através de fermentação em estado sólido. O fungo *Aspergillus niger* (O-4) foi um dos melhores microrganismos produtores de lipases com atividade hidrolítica, com máxima atividade lipolítica de 45,49 U/g. No presente estudo observou-se que o fungo *Aspergillus niger* (O-4) também foi o

microrganismo que se apresentou como o melhor produtor de lipase com atividade de esterificação.

Fungos do gênero *Aspergillus* têm sido citados como produtores de lipases.<sup>20</sup> Entre as cepas de *Aspergillus* estudadas neste trabalho o *Aspergillus niger* tem sido estudado para a produção de lipases com mais frequência que o *Aspergillus fumigatus*. O estudo de lipases produzidas por *Aspergillus fumigatus* é mais recente, sendo citado como produtor de lipases por Brooks e Asamudo,<sup>31</sup> Rajan e Nair<sup>32</sup> e Krikstaponis *et al.*<sup>33</sup>

A partir dos ensaios de seleção dos microrganismos potenciais foi realizada a modificação do meio do cultivo em virtude de no processo de seleção terem sido utilizadas condições de cultivo previamente otimizadas para a produção de lipases com atividade de hidrólise.<sup>21</sup> Rizzardi<sup>20</sup> obteve resultados significativos de atividade enzimática para as condições de 65% de umidade, proporção farelo:casca de 80:20 e adição de 1% de óleo de soja e ureia, sendo estas condições de cultivo, portanto, utilizadas na sequência dos experimentos.

### Avaliação da especificidade por diferentes ácidos graxos

A Tabela 1 apresenta as atividades de esterificação das enzimas produzidas pelos fungos *Aspergillus niger* (O-4) e *Aspergillus fumigatus* em 96 h de fermentação, nos planejamentos fatoriais utilizados para avaliar a influência do ajuste de pH do meio de cultivo, do método de extração da enzima e do ácido graxo utilizado na reação de esterificação. Os experimentos realizados sem ajuste de pH apresentaram valor igual a 6,2.

As enzimas produzidas a partir do *Aspergillus niger* (O-4) (Tabela 1) apresentaram atividade frente aos ácidos oléico (C18:1) e butírico (C4:0) na presença de etanol, não apresentando atividade com a utilização do ácido láurico (C12:0). As enzimas produzidas pelo *Aspergillus fumigatus* não apresentaram atividades de esterificação frente ao ácido láurico, assim como as enzimas produzidas pelo *Aspergillus niger* (O-4), apresentando atividade frente ao ácido de cadeia curta somente no experimento 1, realizado sem o ajuste do pH do meio de cultivo para 4,5 e utilizando o farelo fermentado liofilizado sem a etapa de extração como fonte de enzimas.

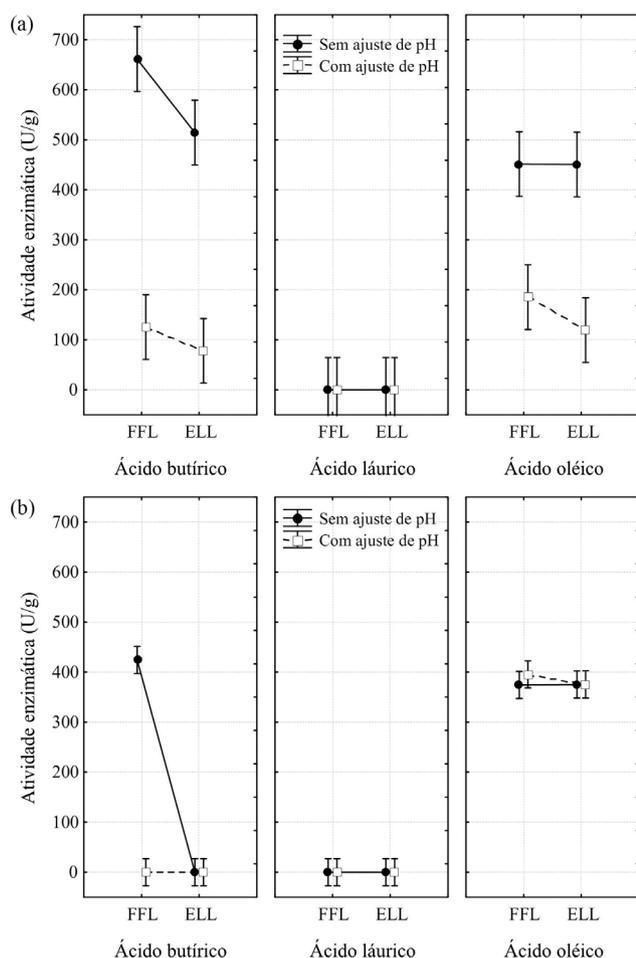
A análise de variância dos resultados para o fungo *Aspergillus niger* demonstrou que a interação dos três fatores estudados (ajuste

**Tabela 1.** Planejamento Fatorial misto 2<sup>2</sup>.3<sup>1</sup> utilizado para avaliar a influência do ajuste de pH do meio de cultivo, a forma de obtenção da enzima e do ácido graxo utilizado na reação de esterificação sobre a atividade de esterificação das lipases produzidas para os fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*

Experimento	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	AE (U/g)*	
				<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
1	Sem	FFL	Butírico	661,43 ± 15,93 <sup>d</sup>	410,75 ± 25,88 <sup>b</sup>
2	Com	FFL	Butírico	125,47 ± 16,73 <sup>ab</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
3	Sem	ELL	Butírico	514,19 ± 52,29 <sup>cd</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
4	Com	ELL	Butírico	78,04 ± 24,53 <sup>ab</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
5	Sem	FFL	Láurico	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
6	Com	FFL	Láurico	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
7	Sem	ELL	Láurico	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
8	Com	ELL	Láurico	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
9	Sem	FFL	Oléico	451,50 ± 0,00 <sup>c</sup>	374,55 ± 0,00 <sup>b</sup>
10	Com	FFL	Oléico	185,52 ± 56,09 <sup>b</sup>	395,43 ± 8,41 <sup>b</sup>
11	Sem	ELL	Oléico	450,59 ± 17,46 <sup>c</sup>	374,88 ± 7,97 <sup>b</sup>
12	Com	ELL	Oléico	119,39 ± 59,69 <sup>ab</sup>	375,48 ± 12,65 <sup>b</sup>

X<sub>1</sub>: ajuste de pH a 4,5; X<sub>2</sub>: forma de obtenção da enzima; X<sub>3</sub>: ácido graxo; AE: atividade de esterificação; FFL: farelo fermentado liofilizado; ELL: extrato líquido liofilizado. \*Resultados de média ± desvio-padrão. Médias seguidas de letras diferentes na coluna apresentam diferença significativa entre si através do teste de Tukey com um nível de significância de 5%.

de pH, forma de extração e ácido graxo) foi significativa ( $p < 0,0001$ ), devendo ser analisada. Verifica-se na Figura 1 que o ajuste do pH do meio de cultivo ocasionou diminuição na atividade frente ao ácido butírico e frente ao ácido oléico. A liofilização direta do farelo fermentado e o uso deste na reação de esterificação permitiu maiores atividades de esterificação frente aos ácidos butírico e oléico, significativamente ( $p < 0,05$ ) diferentes dos valores de atividade obtidos com o pH do meio ajustado a 4,5 (Tabela 1). A atividade de esterificação obtida para o ácido butírico (661,43 U/g) foi significativamente superior ( $p = 0,0099$ ) à obtida para o ácido oléico (451,50 U/g) na condição de cultivo sem o ajuste de pH.



**Figura 1.** Atividade enzimática das enzimas liofilizadas produzidas por (a) *Aspergillus niger* e (b) *Aspergillus fumigatus*, em condições de produção com pH do meio de cultivo ajustado ou não e a partir de diferentes formas de obtenção da enzima liofilizada (FFL: farelo fermentado liofilizado, ELL: extrato líquido liofilizado)

A análise de variância dos resultados para o fungo *Aspergillus fumigatus* também demonstrou que a interação dos três fatores estudados (ajuste de pH, forma de extração e ácido graxo) foi significativa ( $p < 0,0001$ ), devendo ser analisada. Verifica-se na Figura 1 que utilizando o ácido butírico como substrato na reação de esterificação, somente foi observada atividade (410,75 U/g) na condição de cultivo sem o ajuste do pH do meio de cultivo e utilizando-se o farelo fermentado liofilizado diretamente na reação, sem a etapa prévia de extração da enzima, sendo esse resultado semelhante ( $p > 0,05$ ) aos obtidos com a utilização do ácido oléico como substrato, independente das condições de cultivo utilizadas (atividades em torno de 380 U/g).

As enzimas produzidas pelos dois fungos apresentaram comportamento semelhante em relação à especificidade pelos ácidos graxos, ou seja, a especificidade em ordem decrescente foi para o ácido oléico (C18:1) > ácido butírico (C4:0) > ácido láurico (C12:0). Considera-se que ao justificarem-se estes resultados deva-se levar em consideração o tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo e a presença da insaturação. Neste sentido verifica-se a maior afinidade das enzimas pelo ácido graxo de cadeia longa. No entanto, este efeito pode estar sendo influenciado pela presença da insaturação do ácido oléico. No estudo da influência da dupla ligação (comparando os rendimentos do C18:0 e C18:1), Bezbradica *et al.*,<sup>34</sup> utilizando a lipase produzida pela *Candida rugosa* em meio reacional com 2,2,4 trimetilpentano, em condições equimolares dos substratos (álcool utilizado: 3-metil-butanol), verificaram que a síntese do éster de ácido graxo foi duas vezes mais rápida, demonstrando uma afinidade maior dessa lipase por ácidos graxos insaturados, cuja solubilidade é maior em comparação com ácidos graxos saturados. No entanto, deve-se considerar que a solubilidade dos ácidos graxos é também dependente do número de carbonos das moléculas, sendo que quanto menor o comprimento da cadeia, maior a sua solubilidade em água.

Em estudo realizado por Sun *et al.*<sup>35</sup> a não linearidade da especificidade em relação ao tamanho da cadeia carbônica foi demonstrada em resultados obtidos somente com ácidos graxos saturados. A lipase utilizada foi produzida por *Rhizopus chinensis* em fermentação em estado sólido e o sistema reacional consistiu na utilização de n-heptano, ácidos e álcoois em concentrações de 0,6 mol/L. Os ácidos graxos utilizados foram de C4:0 a C16:0 e os álcoois primários do metanol ao 1-octanol. Os resultados obtidos para os ésteres etílicos formados indicaram maior afinidade da enzima pelos ácidos graxos na seguinte ordem, considerando-se as conversões no tempo final de reação: Caprilato (C8:0) > Laurato (C12:0) > Miristato (C14:0) > Palmíto (C16:0) > Caprato (C10:0) > Caproato (C6:0). Verifica-se, no entanto, que nesse estudo o ácido láurico foi o que apresentou a segunda maior atividade, utilizando como aceptor de elétrons o mesmo álcool deste trabalho (etanol).

Resultado semelhante ao anterior em relação à especificidade pelos ácidos graxos foi obtido por Vaidya *et al.*,<sup>36</sup> os quais relataram estudo de especificidade utilizando enzimas comerciais imobilizadas. A enzima de *Candida antarctica* imobilizada em resina de acrilato apresentou melhores resultados de atividade específica quando o ácido graxo utilizado foi o ácido láurico, o que foi explicado pela resistência da difusão de substratos de cadeia longa na estrutura mais rígida das enzimas imobilizadas.

Bezbradica *et al.*<sup>34</sup> mencionam que vários fatores podem influenciar na afinidade por ácidos graxos de cadeia curta e longa, como os relacionados à termodinâmica da reação, visto que a formação do éster, obtida após a clivagem do complexo acil-enzima pelo etanol, pode apresentar uma conversão baixa, ou ainda pela premissa de que as lipases possuem regiões hidrofílicas (para ácidos graxos de cadeia curta, com até 6 átomos de carbono) e hidrofóbicas (para ácidos graxos de cadeia longa, com mais de 6 átomos de carbono) ao redor do sítio catalítico.

Segundo Zaidi *et al.*,<sup>37</sup> Naik *et al.*<sup>38</sup> e Pleiss *et al.*<sup>39</sup> cada lipase pode ter um comportamento diferenciado. A especificidade enzimática está relacionada com o caráter eletrofílico do carbono na molécula doadora de acila, da acidez, do efeito estérico, da proporção dos substratos e da hidrofobicidade do grupo carboxílico. Assim, a fonte de lipases, o método de imobilização, a natureza do solvente e as propriedades dos substratos podem explicar, segundo os autores, as tendências conflitantes encontradas na literatura para os estudos de especificidade.

Silva *et al.*,<sup>27</sup> em estudo da especificidade em termos de atividade de esterificação das enzimas produzidas por *Penicillium brevicompactum* em fermentação em estado sólido, relataram que o ácido oléico

(em combinação com o etanol) apresentou melhores resultados do que com o uso de outros álcoois (metanol, propanol e butanol), enquanto que o ácido butírico apresentou maiores atividades com etanol e butanol. O ácido láurico, por sua vez, apresentou melhores resultados quando do uso do butanol como álcool na reação de esterificação.<sup>29</sup> Verifica-se desta forma que as baixas atividades de esterificação obtidas neste trabalho, quando utilizado o ácido láurico, podem estar relacionadas ao uso do etanol.

Além disso, outro fator que pode justificar as maiores atividades de esterificação obtidas com o ácido oléico é a possível preferência da enzima por ácidos graxos semelhantes aos presentes nos substratos de produção, como é o caso deste trabalho, no qual o óleo de soja foi utilizado como indutor para a síntese de enzimas. Resultados semelhantes foram obtidos por Silva *et al.*<sup>27</sup> e Rigo *et al.*<sup>40</sup>

### Alcoólise de óleo vegetal

A Tabela 2 apresenta as conversões obtidas na alcoólise enzimática do óleo de soja com hexano como solvente orgânico para as lipases produzidas pelos fungos *Aspergillus niger* (O-4) e *Aspergillus fumigatus*. A Figura 2 apresenta o cromatograma obtido no experimento que apresentou a maior conversão em ésteres etílicos. Pode-se observar que o primeiro pico apresentado (tempo de retenção de 4,4 min) corresponde ao padrão interno (C17:0) e ao ácido esteárico (C18:0), enquanto que os picos seguintes são relativos aos ácidos oléico (C18:1, tempo de retenção de 5,1 min), linoléico (C18:2, tempo de retenção de 8,0 min) e linolênico (C18:3, tempo de retenção de 9,0 min).

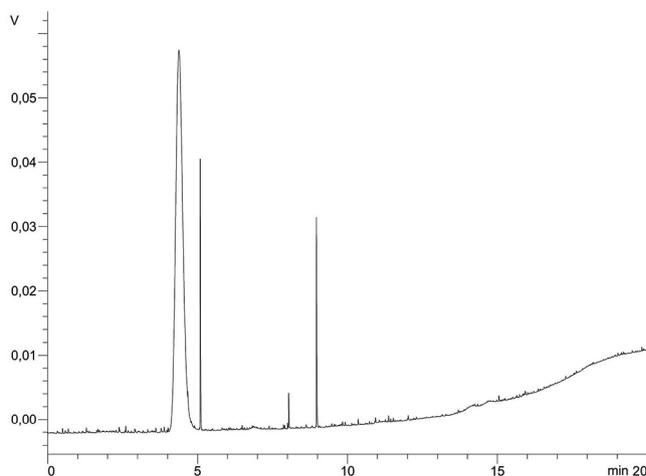
**Tabela 2.** Conversões obtidas na alcoólise enzimática do óleo de soja com hexano como solvente orgânico para as lipases produzidas pelos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*

Experimento	Condições de produção da enzima		Microrganismo	Conversão (%) <sup>*</sup>
	pH do meio	Obtenção da enzima		
1	Sem ajuste	FFL	<i>Aspergillus niger</i>	0,75 ± 0,008 <sup>a</sup>
2	Com ajuste	FFL		1,76 ± 0,012 <sup>c</sup>
3	Sem ajuste	ELL	ELL	2,04 ± 0,004 <sup>d</sup>
4	Com ajuste	ELL		5,32 ± 0,001 <sup>h</sup>
5	Sem ajuste	FFL	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,19 ± 0,001 <sup>e</sup>
6	Com ajuste	FFL		2,55 ± 0,007 <sup>g</sup>
7	Sem ajuste	ELL	ELL	1,57 ± 0,005 <sup>b</sup>
8	Com ajuste	ELL		2,28 ± 0,001 <sup>f</sup>

FFL: farelo fermentado liofilizado; ELL: extrato líquido liofilizado. <sup>\*</sup>Resultados de média ± desvio-padrão. Médias seguidas de letras diferentes na coluna apresentam diferença significativa entre si através do teste de Tukey com um nível de significância de 5%.

Segundo Froehner *et al.*<sup>41</sup> a composição média do óleo refinado de soja apresenta 12,4% de C16:0, 3,7% de C18:0, 27,0% de C18:1; 50,3% de C18:2 e 10,6% de C18:3. Observou-se que houve maior formação de éster do ácido oléico, apesar do óleo original apresentar maior concentração de ácido linoléico. A maior produção de ésteres etílicos de C18:1 e de C18:3 ao invés de ésteres de C18:2 provocou uma menor taxa de conversão, evidenciando uma maior especificidade das enzimas produzidas no processo fermentativo por este ácido graxo insaturado, conforme resultados obtidos na etapa anterior do trabalho.

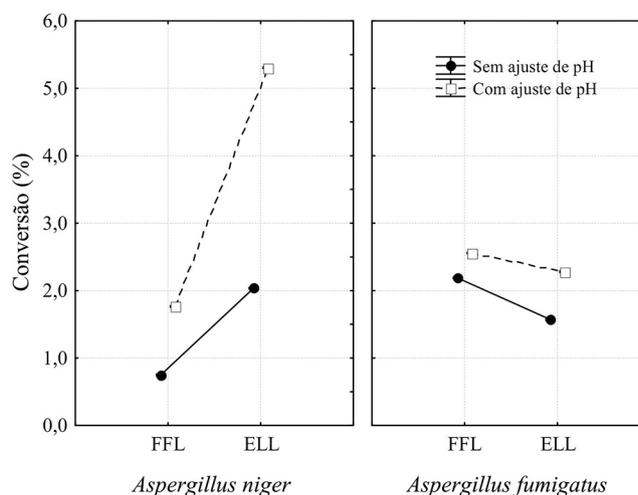
Em um trabalho realizado por Ferrari *et al.*,<sup>42</sup> utilizando catalisador alcalino, obteve-se a formação de ésteres etílicos para produção de biodiesel de soja com a seguinte composição: 11,3% de C16:0,



**Figura 2.** Cromatograma com a identificação dos ésteres etílicos produzidos a partir do experimento 4, utilizando o extrato líquido liofilizado obtido com o fungo *Aspergillus niger* no cultivo sem ajuste de pH

3,5% de C18:0, 22,5% de C18:1, 54,6% de C18:2 e 8,1% de C18:3, apresentando uma composição compatível com o óleo utilizado. Embora o rendimento médio desse processo tenha sido de 57,3%, o uso de catalisadores químicos pode provocar problemas de corrosão e formação de produtos de saponificação quando há ácidos graxos livres, o que não ocorre utilizando catalisadores enzimáticos.

A análise de variância dos resultados de conversão em ésteres etílicos de ácidos graxos demonstrou que todos os fatores foram significativos sobre as conversões ( $p < 0,0001$ ), sendo que a Figura 3 apresenta o gráfico de interação das médias obtidas.



**Figura 3.** Conversões em ésteres etílicos de ácidos graxos obtidas a partir das lipases produzidas em fermentação em estado sólido por *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* (FFL: farelo fermentado liofilizado, ELL: extrato líquido liofilizado)

As conversões obtidas pelas enzimas produzidas pelos fungos foram maiores realizando-se a produção da enzima em meio de cultivo com ajuste de pH. Maiores conversões foram obtidas utilizando o extrato líquido liofilizado para o fungo *Aspergillus niger* (O-4) e utilizando o farelo fermentado liofilizado (sem a extração da enzima em meio líquido) para o *Aspergillus fumigatus*.

As conversões em ésteres etílicos foram inferiores às obtidas por outros autores, como Aguiéiras *et al.*<sup>43</sup> e Skoronski *et al.*,<sup>44</sup> os quais obtiveram rendimentos superiores a 90% com enzimas comerciais ou

imobilizadas, respectivamente. Os resultados deste trabalho podem ser atribuídos à utilização das condições de alcoólise otimizadas por Faccio<sup>24</sup> para a enzima comercial (Novozym 435). Melhores resultados podem ser obtidos fazendo-se ajustes nesta metodologia, como: aumentar a quantidade de enzima, tipo de triacilglicerol, tempo de reação e solvente. A razão molar óleo:álcool é uma das variáveis mais importantes que afetam o rendimento de ésteres de ácidos graxos. Kusdiana e Saka<sup>45</sup> sugerem que razões molares mais altas de óleo:álcool resultem em uma reação de transesterificação mais eficiente, devido ao aumento da área de contato entre álcool e triacilgliceróis.

As conversões obtidas por Silva *et al.*<sup>27</sup> foram de 15,6%, para uma enzima precipitada obtida a partir da torta de babaçu por *Penicillium brevicompactum*, e 6,5% para uma enzima precipitada a partir de farelo de mamona por *Penicillium brevicompactum*. A purificação da enzima por precipitação, bem como a imobilização das enzimas em alginato de sódio e carvão ativado, podem ter contribuído para as maiores conversões. Dessa forma, para ocorrer um aumento nas conversões das enzimas utilizadas neste trabalho, podem-se empregar métodos como precipitação ou imobilização, os quais podem preservar a atividade da enzima. Diferentes sistemas reacionais também podem ser testados visando ao aumento da conversão do processo.

Predabom<sup>46</sup> realizou a alcoólise enzimática de diferentes óleos vegetais utilizando lipase de *Penicillium brevicompactum* fermentada em diferentes misturas de farelo. As maiores conversões foram obtidas na amostra de extrato utilizando a mistura de farelo de arroz e casca de arroz (2,88%) e na amostra de extrato da mistura de farelo de soja e casca de soja (2,48%), ambas utilizando óleo de oliva como substrato para a alcoólise. As conversões obtidas neste trabalho foram semelhantes.

Apesar das taxas de conversão obtidas neste trabalho não terem sido tão altas, deve-se salientar que as enzimas não sofreram processos avançados de purificação e/ou imobilização, indicando que é possível otimizar as condições de operação para que a utilização dessas enzimas produzidas por fungos com resíduos agroindustriais possa ser aplicada em processos biotecnológicos, como na produção de biodiesel.

## CONCLUSÃO

Dos 16 fungos inicialmente testados, apenas dois (*Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*) apresentaram atividade de esterificação (364,58 U/g e 182,92 U/g, respectivamente).

As enzimas produzidas pelo *A. niger* apresentaram atividade de esterificação frente aos ácidos oléico e butírico na presença de etanol, enquanto que as enzimas produzidas pelo *A. fumigatus* não apresentaram atividade de esterificação frente ao ácido láurico. Em relação à ordem de especificidade, esta foi maior para o ácido oléico, seguido do ácido butírico e do ácido láurico. Para o *A. niger* a liofilização direta do farelo fermentado trouxe aumento na atividade de esterificação, enquanto que para o *A. fumigatus* a atividade frente ao ácido oléico não foi influenciada pelo ajuste de pH nem pelo processo de extração da enzima.

As conversões em ésteres etílicos obtidas pelas enzimas produzidas pelos fungos foram maiores realizando-se a produção da enzima em meio de cultivo com ajuste de pH. Maiores conversões (5,3%) foram obtidas utilizando o extrato líquido liofilizado para o fungo *Aspergillus niger*.

O uso de resíduos agroindustriais para produção de lipases por fungos filamentosos em fermentação em estado sólido deve ser incentivado, podendo ter suas condições de processo aprimoradas, a fim de viabilizar a utilização das enzimas em aplicações industriais específicas para cada área.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Professora S. M. Tsai pela identificação dos fungos e à FAPERGS, CAPES, URI e UPF pelo auxílio e bolsa concedidos.

## REFERÊNCIAS

- Iyer, P. V.; Ananthanarayan, L.; *Process Biochem.* **2008**, *43*, 1019.
- Sharma, R.; Chisti, Y.; Benerjee, U. C.; *Biotechnol. Adv.* **2001**, *19*, 627.
- Wang, D.; Xu, Y.; Tianyu, S.; *Biochem. Eng. J.* **2008**, *41*, 30.
- Singh, A. K.; Mukhopadhyay, M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *166*, 486.
- Kapoor, M.; Gupta, M. N.; *Process Biochem.* **2012**, *47*, 555.
- Contesini, F. J.; Lopes, D. B.; Macedo, G. A.; Nascimento, M. G.; Carvalho, P. O.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *67*, 163.
- Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A.; *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 235.
- Dors, G.; Mendes, A. A.; Pereira, E. B.; Castro, H. F.; Furigo Jr., A.; *Appl. Water Sci.* **2013**, *3*, 343.
- Bai, S.; Aziz, S.; Khodadadi, M.; Mitri, C. B.; St-Louis, R.; Kermasha, S.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2013**, *90*, 377.
- Chakraborty, K.; Vijayagopal, P.; Chakraborty, R. D.; Vijayan, K. K.; *Food Chem.* **2010**, *120*, 433.
- Macario, A.; Giordano, G.; *Catal. Lett.* **2013**, *143*, 159.
- Thakur, A.; Kumar, A.; Kanwar, S. S.; *Current Biotechnology* **2012**, *1*, 234.
- Radzi, S. M.; Mustafa, W. A. F.; Othman, S. S.; Noor, H. M.; *World Academy of Science, Engineering and Technology* **2011**, *59*, 677.
- Pilissão, C.; Carvalho, P. O.; Nascimento, M. G.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 1688.
- Silva, V. C. F.; Contesini, F. J.; Carvalho, P. O.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, *19*, 1468.
- Nagarajan, S.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *168*, 1163.
- Shukla, P.; Gupta, P.; *J. Appl. Sci. Environ. Sanitation* **2007**, *2*, 35.
- Couto, S. R.; Sanromán, M. A.; *J. Food Eng.* **2006**, *76*, 291.
- Pandey, A.; *Biochem. Eng. J.* **2003**, *13*, 81.
- Treichel, H.; Oliveira, D.; Mazutti, M. A.; Di Luccio, M.; Oliveira, V. J.; *Food Bioprocess Technol.* **2010**, *3*, 182.
- Colla, L. M.; Rezzadori, K.; Câmara, S. K.; Debon, J.; Tibolla, M.; Bertolin, T. E.; Costa, J. A. V.; *Z. Naturforsch., C: J Biosci.* **2009**, *64*, 131.
- Smaniotta, A.; Skovronski, A.; Rigo, E.; Tsai, S. M.; Durrer, A.; Foltran, L. L.; Di Luccio, M.; Oliveira, J. V.; Oliveira, D.; Treichel, H.; *Braz. J. Microbiol.* **2012**, *43*, 1490.
- Colla, L. M.; Rizzardi, J.; Pinto, M. H.; Reinehr, C. O.; Bertolin, T. E.; Costa, J. A. V.; *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 8308.
- Rizzardi, J.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Brasil, 2012.
- Vargas, G. D. L. P.; Treichel, H.; Oliveira, D.; Beneti, S. C.; Freire, D. M. G.; Di Luccio, M.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2008**, *83*, 47.
- Persson, M.; Mladenoska, I.; Wehtje, E.; Adlercreutz, P.; *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 833.
- Silva, M. F.; Freire, D. M. G.; Castro, A. M.; Di Luccio, M.; Mazutti, M. A.; Oliveira, J. V.; Treichel, H.; Oliveira, D.; *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2011**, *34*, 145.
- Faccio, C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Brasil, 2004.
- Silva, M. F.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Brasil, 2010.
- European Standard EN 14103:2011. Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME). Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. Brussels, 2011.

31. Brooks, A. A.; Asamudo, N. U.; *J. Toxicol. Environ. Health Sci.* **2011**, *3*, 311.
32. Rajan, A.; Nair, A. J.; *Turk. J. Biol.* **2011**, *35*, 569.
33. Krikstaponis, A.; Lugauskas, A.; Krysinska-Traczyk, E.; Prazmo, Z.; Dutkiewicz, J.; *Ann. Agric. Environ. Med.* **2001**, *8*, 227.
34. Bezbradica, D.; Karalazic, I.; Ognjanovic, N.; Mijin, D.; Siler-Marinkovic, S.; Knezevic, Z.; *J. Serb. Chem. Soc.* **2006**, *71*, 31.
35. Sun, S. Y.; Xu, Y.; Wang, D.; *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 2607.
36. Vaidya, A.; Gera, G.; Ramakrishna, A.; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24*, 2987.
37. Zaidi, A.; Gainer, J. L.; Carta, G.; Mrani, A.; Kadiri, T.; Belarbi, Y.; Mir, A.; *J. Biotechnol.* **2002**, *93*, 209.
38. Naik, S.; Basu, A.; Saikia, R.; Madan, B.; Paul, P.; Chatterjee, R.; Brask, J.; Svendsen, A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *65*, 18.
39. Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R. D.; *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *93*, 67.
40. Rigo, E.; Ninow, J. L.; Tsai, S. M.; Durrer, A.; Foltran, L. L.; Remonato, D.; Sychoski, M.; Vardanega, R.; Oliveira, D.; Treichel, H.; Di Luccio, M.; *Food Bioprocess Technol.* **2012**, *5*, 1592.
41. Froehner, S.; Leithold, J.; Lima Jr., L. F.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 2016.
42. Ferrari, R. A.; Oliveira, V. S.; Scabio, A.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 19.
43. Aguiéiras, E. C. G.; Souza, S. L.; Langone, M. A. P.; *Quim. Nova* **2013**, *36*, 646.
44. Skoronski, E.; João, J. J.; Cechinel, M. A. P.; Fernandes, M.; *Quim. Nova* **2013**, *36*, 364.
45. Kusdiana, D.; Saka, S.; *J. Chem. Eng. Jpn.* **2001**, *34*, 383.
46. Predabon, S. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Brasil, 2011.