

URI – CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**Concentração, Imobilização e Caracterização Parcial de
Lipase produzida por *Penicillium verrucosum* utilizando
Fermentação em Estado Sólido**

Silvana Menoncin

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

ERECHIM, RS – BRASIL
FEVEREIRO DE 2007

Concentração, Imobilização e Caracterização Parcial de Lipase produzida por *Penicillium verrucosum* utilizando Fermentação em Estado Sólido

Silvana Menoncin

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

Comissão Julgadora:

Débora de Oliveira, D.Sc.
(Orientadora)

Helen Treichel, D.Sc.
(Orientadora)

Eliana Setsuko Kamimura, D.Sc.

Geciane Toniazzo, D.Sc.

Erechim, 27 de fevereiro de 2007.

*Dedico esta conquista a meus pais, Selvino e Ivete,
por todo apoio e incentivado à vencer as dificuldades
encontradas na busca da realização de meus objetivos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado força em todos os momentos de dificuldade. Sem Ele nada teria conseguido.

Aos meus pais Selvino e Ivete, meus irmãos Silvete e Carlos e à minha madrinha Lurdes por todo carinho e incentivo que me deram.

Ao meu grande amor Eluzardo por todos os momentos de alegrias vividos, por todo apoio, incentivo e compreensão.

Aos demais familiares e amigos que sempre me apoiaram e incentivaram nesta etapa vivida.

Às professoras Débora e Helen por compartilharem de seus conhecimentos, pela orientação durante a realização deste trabalho, pelo carinho, amizade e incentivo em todos os momentos.

Ao professor Marco Di Luccio por toda a contribuição dada para a realização deste trabalho

À minhas colegas e amigas de turma, pelos momentos de alegrias vividos e experiências compartilhadas.

À bolsista Natália, pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos demais colegas e amigos do Laboratório de Biotecnologia e da Central de Materiais pela amizade, incentivo e ajuda nos momentos necessários.

Às minhas grandes amigas Camila e Ieda, pela paciência, carinho, amizade, pelo ombro amigo nos momentos difíceis e por todos os momentos de alegria vividos durante este tempo em que convivemos.

À URI-Campus de Erechim e ao Departamento de Engenharia de Alimentos, por possibilitarem minha formação.

À INTECNIAL por fornecer apoio financeiro, viabilizando a realização deste projeto.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. DEFINIÇÃO DE LIPASES.....	4
2.2.APLICAÇÕES DE LIPASES.....	5
2.3.FONTES E PROPRIEDADES DAS LIPASES.....	7
2.4.PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	9
2.5.CONCENTRAÇÃO DE LIPASES.....	12
2.6.IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES.....	14
2.7.CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS LIPASES.....	16
2.8.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1.MATERIAIS.....	19
3.2. EQUIPAMENTOS.....	20
3.3.MÉTODOS.....	21
3.3.1. PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	21
3.3.1.1. Microrganismo.....	21
3.3.1.2. Inóculo.....	21
3.3.1.3. Preparo dos Meios de Cultivo.....	22
3.3.1.4. Preparo das Amostras.....	22
3.3.1.5. Atividade de Hidrólise.....	23
3.3.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO.....	24
3.3.3. CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO.....	25
3.3.3.1. Precipitação com sulfato de amônio.....	25
3.3.3.2. Diálise do extrato enzimático concentrado.....	27
3.3.4. IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES PRECIPITADAS.....	27

3.3.5. CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LIPASE DE <i>Penicillium</i> <i>verrucosum</i>	30
3.3.5.1. Temperatura e pH ótimos do extrato enzimático concentrado.....	31
3.3.5.2. Estabilidade da Torta Fermentada, do Extrato Enzimático Bruto e da Lipase Concentrada a baixas temperaturas.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DA LIPASE.....	33
4.2. CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO	36
4.3. IMOBILIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO PRODUZIDO POR FES...	47
4.4. CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LIPASE	49
4.4.1. TEMPERATURA E pH ÓTIMOS DO EXTRATO ENZIMÁTICO CONCENTRADO.....	49
4.4.2. ESTABILIDADE DA TORTA FERMENTADA, DO EXTRATO BRUTO E DO EXTRATO CONCENTRADO ARMAZENADOS A BAIXAS TEMPERATURAS.....	52
4.4.2.1 Estabilidade da torta fermentada em temperatura de congelamento...	52
4.4.2.2. Estabilidade do extrato bruto em temperatura de congelamento.....	53
4.4.2.3. Estabilidade do extrato enzimático concentrado armazenado em geladeira.....	54
4.4.4.4. Estabilidade do extrato enzimático concentrado armazenado em congelador.....	55
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES	58
5.1. CONCLUSÕES.....	58
5.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	59
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
7 ANEXOS	68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Fontes de carbono (substrato principal) utilizadas para Fermentação em Estado Sólido.....	11
Tabela 2.2. Atividades específicas obtidas na precipitação com sulfato de amônio relatadas na literatura.....	13
Tabela 3.1. Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^2 para otimização das condições de extração.....	24
Tabela 3.2. Variáveis e níveis estudados no planejamento de experimentos 2^2 para concentração do extrato enzimático obtido por <i>P. verrucosum</i>	25
Tabela 3.3. Variáveis e níveis estudados no segundo planejamento fatorial completo 2^2 para concentração do extrato enzimático obtido por <i>P. verrucosum</i>	25
Tabela 3.4. Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^2 para a determinação do pH e temperatura ótimos.....	31
Tabela 4.1. Matriz do planejamento experimental realizado (valores codificados e reais com as respostas da atividade lipásica) para extração da lipase de <i>P. verrucosum</i>	34
Tabela 4.2. Análise de variância para a atividade lipásica do extrato enzimático bruto obtido por <i>Penicillium verrucosum</i>	35
Tabela 4.3. Matriz do primeiro planejamento experimental realizado (valores codificados e reais com as respostas da atividade lipásica) para precipitação do extrato enzimático obtido por FES utilizando <i>P. verrucosum</i>	37
Tabela 4.4. Análise de variância para a atividade lipásica do extrato enzimático concentrado obtido por <i>Penicillium verrucosum</i>	38
Tabela 4.5. Matriz do primeiro planejamento experimental realizado (valores codificados e reais com as respostas da atividade específica) para avaliação do efeito da diálise das lipases de <i>Penicillium verrucosum</i>	40

Tabela 4.6. Matriz do segundo planejamento experimental realizado (valores codificados e reais com as respostas da atividade específica) para a precipitação do extrato enzimático.....	41
Tabela 4.7. Matriz do segundo planejamento experimental realizado (valores codificados e reais com as respostas da atividade específica) para avaliação do efeito da diálise do extrato enzimático precipitado.....	43
Tabela 4.8. Análise de variância para a atividade lipásica do extrato enzimático concentrado obtido por <i>Penicillium verrucosum</i> , após diálise.....	44
Tabela 4.9. Médias da atividade específica da lipase de <i>P. Verrucosum</i> e Desvios Padrão encontrados na análise dos resultados obtidos nos testes com diálise pelo Teste de Tukey.....	46
Tabela 4.10. Valores da Atividade Específica, Retenção, Rendimento e Conteúdo de água na imobilização da lipase produzida por FES utilizando <i>Penicillium verrucosum</i>	47
Tabela 4.11. Matriz do planejamento experimental realizado (valores codificados e reais com as respostas da atividade lipásica) para a caracterização parcial do extrato enzimático concentrado.....	49
Tabela 4.12. Análise de variância para a atividade lipásica na etapa de caracterização parcial do extrato enzimático concentrado.....	51
Tabela 7.1. Curva Padrão Albumina utilizada para medida de proteína pelo método de Bradford.....	68
Tabela 7.2. Características Carvão Ativo ANF – Carvorite.....	70
Tabela 7.3. Curva de Calibração utilizada para medida de atividade de hidrólise do extrato enzimático imobilizado.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Características do fungo <i>Penicillium verrucosum</i>	8
Figura 2.2. Classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas (Dalla–Vecchia <i>et al.</i> , 2004).....	15
Figura 3.1. Béqueres utilizados para a FES do farelo de soja utilizando <i>Penicillium verrucosum</i>	22
Figura 4.1. Superfície de resposta e curva de contorno para atividade lipásica obtida na otimização das condições de extração da lipase produzida por FES.....	35
Figura 4.2. Superfície de resposta e curva de contorno para atividade lipásica obtida no estudo das condições de precipitação por sulfato de amônio por FES	39
Figura 4.3. Gráfico de Pareto da precipitação do extrato enzimático produzido por FES em função das variáveis estudadas após diálise.....	40
Figura 4.4. Gráfico de Pareto da precipitação do extrato enzimático produzido por FES em função das variáveis estudadas após precipitação.....	42
Figura 4.5 Superfície de resposta e curva de contorno para atividade lipásica obtida na precipitação da lipase produzida por FES após diálise.....	45
Figura 4.6. Foto da enzima imobilizada com Accurel EP 100 (direita) e Carvão Ativo (esquerda).....	48
Figura 4.7. Superfície de resposta e curva de contorno para atividade lipásica obtida na avaliação da temperatura e pH ótimos para o extrato enzimático concentrado.....	51
Figura 4.8. Gráfico de Barras da estabilidade da torta de soja fermentada armazenada em congelador (-10°C).....	53

Figura 4.9. Gráfico de Barras da estabilidade do extrato enzimático bruto aquoso armazenado em congelador (-10°C).....	54
Figura 4.10. Gráfico de Barras da estabilidade do extrato enzimático concentrado armazenado em geladeira (4°C).....	55
Figura 4.11. Gráfico de Barras da estabilidade do extrato enzimático concentrado armazenado em congelador (-10°C).....	56

RESUMO

CONCENTRAÇÃO, IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LIPASE PRODUZIDA POR *Penicillium verrucosum* UTILIZANDO FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Silvana Menoncin

Fevereiro/2007

Orientadoras: Débora de Oliveira e Helen Treichel

As lipases de origem microbiana constituem um importante grupo de enzimas com alto potencial biotecnológico, porém sua aplicação é bastante reduzida devido ao seu custo de produção. A imobilização das enzimas visa a obtenção de um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Neste trabalho buscou-se a avaliação das condições de extração, de concentração com sulfato de amônio e imobilização em dois suportes, bem como a caracterização parcial dos extratos enzimáticos (em termos de temperatura e pH ótimos e estabilidade em baixas temperaturas). Observou-se que 37°C e pH 7,0 foi a condição otimizada para a extração e que 60% de saturação com 5 horas foi a condição maximizada para a precipitação da lipase com sulfato de amônio. A enzima imobilizada com Carvão Ativo foi a que apresentou melhores resultados em termos de atividade específica ($1,5 \times 10^6$ U/mg de proteína), rendimento (30,42%) e retenção (382,51%). Na caracterização parcial da enzima precipitada, a temperatura de 42°C e pH 8,5 foram as condições ótimas encontradas. A torta de soja fermentada pôde ser armazenada em temperatura de congelamento até 56 dias sem perda da atividade de hidrólise e o extrato bruto apresentou um aumento de atividade ao final do período de acompanhamento, 218 dias. O estudo realizado com o extrato enzimático concentrado indicou que tanto a 4°C como a -10°C a atividade de hidrólise é praticamente a mesma da inicial, após 91 dias de armazenamento.

ABSTRACT

CONCENTRATION, IMOBILIZATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF LIPASE FROM *Penicillium verrucosum* BY SOLID STATE FERMENTATION

Silvana Menoncin

Fevereiro/2007

Advisors: Débora de Oliveira
 Helen Treichel

Lipases from microbial organisms comprise an important group of enzymes with potential biotechnological interest but with unfavorable production costs. Towards establishing cost-effective systems, enzyme immobilization has been attempted as an alternative to the use of free enzymes. In this context, the main objective of this work was to evaluate the conditions of the extraction, concentration in ammonium sulphate and immobilization using two supports, as well as the partial characterization of the enzymatic extracts (in terms of optimum temperature and pH and stability at low temperatures). The best extraction condition was determined to be at 37°C and pH 7.0 and that 60% of saturation in 5 hours was the maximized condition for the precipitation with ammonium sulphate. The enzyme immobilized with activated carbon led to best results in terms of specific activity (1.5×10^6 U/mg of protein), yield (30.42%) and retention (382.51%). Regarding enzyme partial characterization, the most proper condition found was 42°C and pH 8.5. It was possible to store the frozen fermented soy cake for 56 days without verified losses of hydrolysis activity. The raw extract presented an enhancement of activity at the end of the storage period, 218 days. Results showed that the concentrated enzymatic extract at 4°C as well as -10°C exhibit negligible change in the hydrolysis activity after 91 days of storage.

1 INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas que catalisam a quebra de gorduras e óleos liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Podem também catalisar reações de esterificação, transesterificação e interesterificação em solventes orgânicos (Villeneuve *et al.*, 2000). São biocatalisadores de grande valor, devido principalmente a características como: ação sob condições amenas, estabilidade em solventes orgânicos, especificidade ao substrato e régio enâncio seletividade (Snellman *et al.*, 2002).

Estas enzimas são encontradas em tecidos animais, vegetais e em microrganismos (bactérias, fungos e leveduras) (Villeneuve *et al.*, 2000), tendo suas propriedades variadas de acordo com sua procedência (Saxena *et al.*, 2003). As lipases provenientes de microrganismos constituem um grupo de importantes enzimas de aplicações biotecnológicas, devido principalmente à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática, especificidade pelo substrato e facilidade de produção em grandes quantidades (Hasan *et al.*, 2006).

Podem ser aplicadas na indústria oleoquímica em processos que consomem grande quantidade de energia como hidrólise, glicerólise e alcoólise, na produção de ácidos graxos poliinsaturados (aditivos de alimentos), na indústria têxtil (melhoria da qualidade e propriedade dos tecidos) (Hasan *et al.*, 2006) e na indústria de detergentes (remoção de manchas de batom, frituras, manteiga, azeites, molhos, etc.) (Castro *et al.*, 2004).

São utilizadas também na modificação de sabores (no processo de fermentação de salame e vinho) (Hasan *et al.*, 2006). Na indústria de laticínios são empregadas no melhoramento do sabor e processo de maturação de queijos e na obtenção de margarinas com baixo teor calórico (Alonso, 2001), entre outras. No entanto, sua utilização é reduzida devido aos altos custos de produção e purificação e na busca por novas cepas produtoras que produzam mais quantidade em tempos menores, com características desejáveis (Martins, 2001).

As lipases podem ser produzidas por fermentação em estado sólido (FES) sendo que esta se baseia no crescimento e metabolismo dos microrganismos em

substratos sem a presença de água livre. Dentre as vantagens da FES pode-se citar a economia de espaço para a realização das fermentações, simplicidade dos equipamentos utilizados para fermentação e altos rendimentos, entre outras (Mahadik *et al.*, 2002).

Os resíduos gerados nos processos agroindustriais podem ser usados como substrato para o crescimento celular, a matéria orgânica presente neste material é usada como fonte de energia para o crescimento e carbono para a síntese de biomassa celular e dos produtos do metabolismo microbiano (Silva *et al.*, 2005).

No entanto, muitas enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocados ou durante o uso. A técnica da imobilização é utilizada para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação no final do processo (Villeneuve *et al.*, 2000).

O método de imobilização por adsorção ainda é o mais comum. Este apresenta baixo custo, poucos efeitos deletérios para a atividade e seletividade da enzima. Vários materiais podem ser utilizados e a escolha de um deles depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzimas e custo, sendo que a eficiência da adsorção depende do tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial adsorvente e, principalmente, da porosidade e tamanho dos poros (Villeneuve *et al.*, 2000).

Com base nestes aspectos, o objetivo geral deste trabalho foi a caracterização da lipase produzida em FES (*Penicillium verrucosum*), verificação da sua estabilidade em condições de congelamento e imobilização da mesma. Como objetivos específicos pode-se citar: otimização das condições de extração, estudo das condições de precipitação, imobilização da enzima em resina polimérica (Accurel EP100) e Carvão Ativado e caracterização parcial da enzima precipitada em termos de pH e temperatura ótimos, estabilidade da enzima precipitada em temperatura de 4°C e -10°C, estabilidade de torta de soja fermentada e do extrato bruto em temperatura de -10°C, O trabalho foi dividido em capítulos, os quais contemplam uma revisão da literatura (Capítulo 2), a

Capítulo 1– Introdução

apresentação dos materiais e metodologias utilizadas (Capítulo 3), os resultados obtidos e a discussão dos mesmos (Capítulo 4) e, no Capítulo 5, são apresentadas as conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão da literatura referente à definição, aplicações, fontes e propriedades de lipases e considerações gerais sobre Fermentação em Estado Sólido. Ênfase especial será dada ao processo de extração, estudo da concentração, imobilização e caracterização parcial de lipases, temas de interesse específico deste trabalho.

2.1. DEFINIÇÃO DE LIPASES

Lipases (triacilglicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a quebra de gorduras e óleos liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Além disso, elas são também eficientes em várias reações tais como esterificação, transesterificação e interesterificação em solventes orgânicos. Estas enzimas são encontradas em tecidos animais, vegetais e em microrganismos, tendo papel fundamental no metabolismo de lipídios destes seres vivos: como enzimas digestivas, a deposição e mobilização dos tecidos de reservas energéticas e no metabolismo intracelular, atuando sobre as membranas celulares (Villeneuve *et al.*, 2000).

As lipases eram tradicionalmente obtidas de pâncreas de animais. A descoberta foi feita por Claude Bernard, em 1856 e anos mais tarde, aumentou o interesse pelas lipases microbianas devido à dificuldade de acesso ao material de origem animal (Hasan *et al.*, 2006).

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

As lipases são originárias de um grande número de bactérias, fungos, plantas e animais, tendo suas propriedades variáveis de acordo com sua procedência (Saxena *et al.*, 2003). As lipases provenientes de microrganismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, devido

principalmente à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato e facilidade de produção em escala, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial (Hasan *et al.*, 2006).

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

2.2. APLICAÇÕES DE LIPASES

O uso de lipases nas indústrias permite o desenvolvimento de processos tecnológicos muito próximos aos eficientes processos executados pela natureza. Constituem o mais importante grupo de enzimas com valor biotecnológico, devido à versatilidade de aplicações possíveis e facilidade de produção em larga escala. A economia de energia e minimização da degradação térmica são provavelmente as maiores vantagens na substituição de tecnologias químicas atuais pelas biológicas (Hasan *et al.*, 2006).

Entre as vantagens que o uso de lipases apresenta sobre os processos químicos convencionais estão (Xu, 2000):

- Alta eficiência em condições de baixa temperatura e pressão atmosférica;
- Redução da poluição ambiental;
- Produtos originados de reações enzimáticas são considerados “naturais” pela legislação da maioria dos países;
- Lipases apresentam vários graus de seletividade, ao contrário dos catalisadores convencionais, gerando menos produtos secundários e reduzindo a necessidade de purificação.

O âmbito para a aplicação de lipases na indústria oleoquímica é enorme. Óleos e gorduras são produzidos no mundo a uma escala de aproximadamente 60 milhões de toneladas por ano e uma substancial parte (2 milhões por ano) é

utilizada em processos que consomem uma grande quantidade de energia como hidrólise, glicerólise e alcoólise (Hasan *et al.*, 2006).

Devido ao seu valor nutritivo, a não degradação de ácidos graxos poliinsaturados pode ser importante para a preservação de aditivos de alimentos tais como mono e diacilgliceróis, sendo este último, o principal componente dos novos óleos comestíveis. Entretanto, apesar de sua superioridade aparente, os métodos enzimáticos ainda não alcançaram um nível de exploração comercial proporcional a seu potencial de aplicações (Hasan *et al.*, 2006).

Na indústria têxtil, as lipases são usadas para ajudar na remoção de lubrificantes, a fim de promover uma melhor absorção da tinta no tecido. Seu uso reduz também riscos e rachaduras nos sistemas de abrasão de *jeans*. As preparações comerciais usadas para o *design* de *jeans* e outros tecidos de algodão contêm as enzimas alfa amilase e lipase. Fibras sintéticas modificadas enzimaticamente são utilizadas para a produção de fios e tecidos usados na produção de tapetes e outros artigos de consumo, dando a eles maior resistência ao estiramento, enrugamento, abrasão e ao tratamento com produtos químicos. O uso de poliesterases melhora as habilidades do tecido de poliéster em fixar outros produtos químicos como compostos catiônicos, tintura, compostos antiestáticos, antimanchas e/ou compostos desodorizantes (Hasan *et al.*, 2006).

O campo de aplicação comercialmente mais importante para as lipases hidrolíticas é a sua adição aos detergentes, sendo responsável pela remoção de manchas de gorduras tais como batom, frituras, manteiga, azeites, molhos e as difíceis manchas em colarinhos e punhos (Castro *et al.*, 2004). Para melhorar a detergência, o tipo moderno de detergentes em pó e detergentes usados em lavagens contêm geralmente uma ou mais enzimas, tais como proteases, amilases, celulasas e lipases. As enzimas permitem o uso de temperaturas mais baixas de lavagem e os produtos químicos adicionados aos detergentes são reduzidos. Além disso, estes catalisadores tornam o produto biodegradável, não deixando nenhum resíduo prejudicial, não tendo impacto negativo no processo de tratamento e não apresentando risco ao meio ambiente (Hasan *et al.*, 2006).

As lipases são utilizadas também para modificar o sabor dos alimentos pela síntese dos ésteres, dos ácidos graxos e álcool de cadeias curtas, que são os compostos básicos do sabor e aroma. São utilizadas também para a produção de carne de peixe e margarina com reduzido teor calórico, além de atuarem no processo de fermentação de salames e vinhos (Hasan *et al.*, 2006). Na indústria de queijos são empregadas na alteração e intensificação do sabor e em processos de aceleração da maturação (Alonso, 2001).

As lipases são utilizadas nos processos de tratamento de efluentes, onde as finas camadas de gorduras devem ser continuamente removidas da superfície dos tanques para permitir a transferência de oxigênio (para manutenção da biomassa presente). Tal fato é importante em muitas operações como a degradação de restos orgânicos, tratamento de efluentes, limpeza de tanques, etc (Hasan *et al.*, 2006).

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

2.3. FONTES E PROPRIEDADES DAS LIPASES

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

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

espécies é saprófita e geralmente encontrada no solo, vegetais podres, sementes e grãos (Jesus *et al.*, 1999). Apresenta como características principais: colônia radialmente sulcada, velutinosas, micélio branco, conidiogênese moderada de cor verde-acizentada. A Figura 2.1 apresenta algumas características do fungo *Penicillium verrucosum* microrganismo utilizado para o desenvolvimento deste trabalho sendo este utilizado também por Pinheiro, 2006 na produção de lipases por fermentação submersa, o qual obteve atividade lipásica na ordem de 2 U/mL.

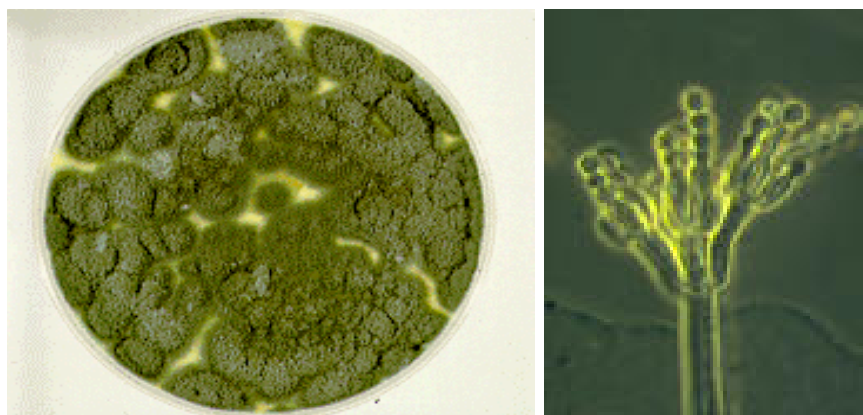


Figura 2.1. Características do fungo *Penicillium verrucosum*.

Cabe salientar que dentre as enzimas hidrolíticas de maior interesse estão as lipases, que são biocatalisadores versáteis capazes de catalisar diferentes reações, tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito. Entre as lipases de vegetais, animais e microbianas estas últimas são as mais utilizadas e, na sua grande maioria, não são nocivas à saúde humana (Carvalho *et al.*, 2005).

Além disto, as lipases microbianas são freqüentemente mais utilizadas que as derivadas de plantas ou animais devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, a facilidade de manipulação genética, por ser uma fonte regular devido à ausência de flutuação sazonal e o rápido crescimento do microrganismo em resíduos. As enzimas microbianas são também mais estáveis do que as enzimas de plantas e animais e sua produção é mais conveniente e mais segura (Hasan *et al.*, 2006).

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

Dentre os processos de produção destes biocatalisadores destaca-se a fermentação em estado sólido pela série de vantagens que apresenta. Tal processo será detalhado a seguir, também em função de ter sido a técnica utilizada para a produção de lipase de *Penicillium verrucosum*, objeto de estudo deste trabalho.

2.4. PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A técnica da Fermentação em Estado Sólido (FES) envolve o crescimento e o metabolismo dos microrganismos em sólidos úmidos sem a presença de água livre. Dentre as vantagens apresentadas por esta técnica pode-se citar a economia de espaço necessária para a fermentação, simplicidade dos meios de fermentação, os equipamentos utilizados para a fermentação são simples e de fácil controle, altos rendimentos de produção, menor demanda de energia, entre outras (Mahadik *et al.*, 2002).

Uma das principais características da FES é a utilização de substratos com baixa atividade de água. Somente os fungos filamentosos e leveduras, baseando-se na classificação teórica, seriam microrganismos capazes de se desenvolver na FES (Pandey, 2003).

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

para o crescimento e o carbono para a síntese de biomassa celular e dos produtos do metabolismo microbiano (Silva *et al.*, 2005).

Outras vantagens apresentadas pela FES são a superior produtividade, a pequena quantidade de água presente no resíduo e facilidade de recuperação do produto. Porém, a FES geralmente é lenta, em função da barreira à transferência de massa gerada durante a fermentação. Entretanto, os processos metabólicos dos microrganismos são influenciados pela mudança de temperatura, de pH, de substrato, do índice de umidade, do fornecimento de ar, da concentração de inóculo, etc., sendo que estas circunstâncias variam extensamente de espécie para espécie. Assim, torna-se muito importante saber as condições ambientais dos microrganismos para a máxima produção (Ellaiah *et al.*, 2004).

A Fermentação em Estado Sólido apresenta outras características tais como (Bianchi *et al.*, 2001; Sato e Sudo, 1999; Palma *et al.*, 2000; Gervais e Molin, 2003):

- A redução da umidade do meio é provocada pelo calor gerado durante o processo de crescimento e metabolismo do microrganismo devido à elevação de temperatura gerada;
- O cultivo é geralmente estacionário, devido à dificuldade de agitação do meio. A agitação pode causar danos às células em alguns casos;
- Pode-se adicionar nutrientes suplementares ao substrato sólido;
- O volume de meio reacional é reduzido, implicando em um menor investimento capital em bioreatores;
- Altos rendimentos quanto à formação de metabólitos e simplicidade nas etapas de purificação, pois os produtos estão concentrados no líquido da extração;
- Os esporos dos microrganismos podem ser utilizados diretamente na inoculação, evitando etapas prévias como pré-cultivo que envolvem grandes volumes de meio e tanques para seu desenvolvimento.

Na FES a seleção de um substrato apropriado para a fermentação é um dos fatores críticos e envolve assim a seleção de um grande número de resíduos agroindustriais que favoreçam o crescimento microbiano (Ellaiah *et al.*, 2004).

Tabela 2.1. Fontes de carbono (substrato principal) utilizadas para Fermentação em Estado Sólido.

Autor/ ano	Substratos
Silva <i>et al.</i> , 2000; Ellaiah <i>et al.</i> , 2004	farelo de trigo
Ellaiah <i>et al.</i> , 2004	farelo de arroz
Domingues <i>et al.</i> , 2003	farelo de cevada
Cordova <i>et al.</i> , 1998; Ellaiah <i>et al.</i> , 2004	bagaço de cana-de-açúcar
(Benjamin e Pandey, 2000	<i>torta de coco</i>
Vargas, 2004; Pinheiro, 2006	torta de soja
Palma <i>et al.</i> , 2000; Gombert <i>et al.</i> , 1999; Castilho <i>et al.</i> , 2000	torta de babaçu

A temperatura e tempo de fermentação são bastante variáveis, dependendo do microrganismo este pode variar de 1 a 7 dias, e a temperatura de 20 a 40°C. O equipamento utilizado para a fermentação é composto por câmaras de fermentação de volume definido, com controle de temperatura e porcentagem de umidade do meio. Em escala laboratorial são utilizadas bandejas menores ou placas de Petri, que são acondicionadas nas câmaras (Alonso, 2001).

Além e imediatamente após a obtenção de condições de processo (temperatura e umidade) ideais para a máxima produção de enzimas por FES, é de fundamental importância a otimização das condições de extração, pois através desta etapa pode-se definir as condições que conduzam à máxima atividade enzimática, conhecer as faixas de atuação das lipases e, conseqüentemente, definir as suas possíveis aplicações.

Além disso, o extrato obtido geralmente possui maior estabilidade quando comparado à torta fermentada, facilitando a aplicabilidade da enzima bruta em processos, bem como as etapas posteriores de purificação e imobilização. No entanto, poucos são os trabalhos apresentados na literatura concernentes à

otimização das condições de extração para lipases obtidas por FES, sendo esta etapa também efetuada durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Apenas como referencial teórico, Vikineswary *et al.* (2006) encontraram como condições ótimas de extração de lacase produzida por *Pycnoporus sanguineus* pH de 5,0 em $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, na qual a atividade encontrada foi de 46,5 U/g de substrato.

Castilho *et al.* (2000) em seu estudo para a otimização das condições de extração de pectinases obtidas de *Aspergillus niger*, definiram o uso do tampão de acetato pH 4,4 e a temperatura de 35°C como ideais.

2.5. CONCENTRAÇÃO DE LIPASES

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

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

Independente da fonte de lipase ou da técnica empregada, a pré-purificação tem uma capacidade limitada no que se refere ao aumento da atividade específica, mantendo o aumento sempre dentro de uma faixa (Koblitz, 2003).

Na literatura são relatados vários trabalhos sobre precipitação de lipases com sulfato de amônio, como pode ser observado na Tabela 2.1.

Tabela 2.2. Atividades específicas obtidas na precipitação com sulfato de amônio relacionadas na literatura.

Autor/ ano/ saturação	Fonte	Atividade do extrato enzimático	Atividade específica (U/mg de proteína)
Benjamin e Pandey (2000) (20% a 100%)	<i>Candida rugosa</i>	18,14 U/mL	3,88
Bacha <i>et al.</i> (2005) (60%)	lipase de pâncreas de avestruz	116000 U	521
Sharma <i>et al.</i> (2002) (30% a 70%)	<i>Bacillus</i> sp. RSJ – 1	2425 U	44,82
Kanwar <i>et al.</i> (2002) (60%)	<i>Pseudomonas</i>	14,750 U	19,46
Shu <i>et al.</i> (2006) (70%)	<i>Antrodia cinnamomea</i>	188,7 U	12,7
Kakugawa <i>et al.</i> (2002) (80%)	<i>Kurtzmanomyces</i> sp. I – 11	4,860 U	3,52
Pastore <i>et al.</i> (2003) (70%)	<i>Rhizopus</i> sp	135600 U	103
Jesus <i>et al.</i> (1999) (80%)	<i>Penicillium restrictum</i>	31,038 U	14,1
Abbas <i>et al.</i> (2002) (75%)	<i>Mucor</i> sp	118099 U	129

2.6. IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, a técnica da imobilização é utilizada para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização (Villeneuve *et al.* 2000).

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica. A Figura 2.2 mostra, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

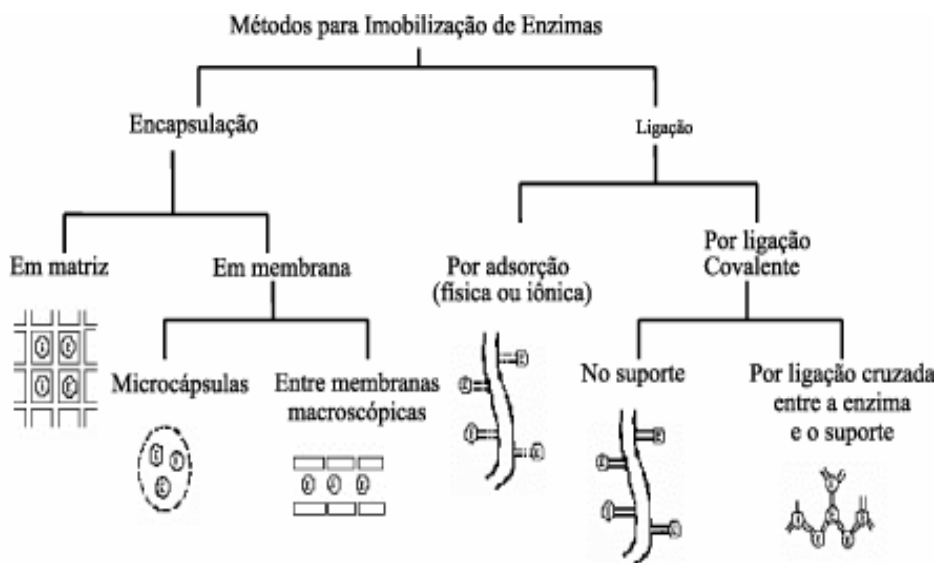


Figura 2.2. Classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

O método de imobilização por adsorção ainda é o mais comum. Este apresenta baixo custo, poucos efeitos deletérios para atividade e seletividade da enzima. A enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como interação de Van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras. Vários materiais podem ser usados para este propósito e a escolha de um deles depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzimas e custo. O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte, que em geral é na superfície, dependem de vários parâmetros, tais como tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e, principalmente, da porosidade e tamanho dos poros (Villeneuve *et al.*, 2000).

As imobilizações por adsorção são usualmente realizadas pela incubação do suporte e da enzima em tampão ou pela precipitação da lipase com solventes, como acetona, sobre a superfície do suporte. Ao contrário do que ocorre com

outras proteínas, a adsorção de lipases é favorecida em meios com baixa força iônica (Bastida *et al.*, 1998).

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

Dentre os trabalhos encontrados na literatura pode-se citar o de Kaewthong *et al.* (2005) os quais, imobilizando a lipase PS (Amano) em diferentes suportes, obtiveram rendimentos de 37,16% utilizando Accurel EP100 (<200 µm), na imobilização em Accurel EP 100 (200-400 µm) o rendimento encontrado foi de 31,10%, em carbonato de cálcio obtiveram rendimento de 0,79%, em Celite rendimento de 3,56%, em Sílica Gel o rendimento foi de 6,42% e em Carvão Ativado obteve rendimento de 0,36%. Já Bryjak e Trochimczuk (2006), na imobilização de lipase de *Candida rugosa* por adsorção em suportes acrílicos, encontraram rendimento máximo de 25,4%. Em termos de retenção de atividade, Knezevic *et al.* (2002), imobilizando lipases de *Candida rugosa* em diferentes concentrações de alginato, obtiveram retenção máxima de 79,99%.

2.7. CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LIPASES

As lipases constituem o mais importante grupo de enzimas com valor biotecnológico, por causa da versatilidade de aplicações possíveis e facilidade de produção em grandes quantidades (Hasan *et al.*, 2006). Neste sentido, a caracterização destas enzimas (extrato bruto, extrato concentrado, enzima purificada ou enzima imobilizada) é de suma importância para o estabelecimento das condições de aplicação, como temperatura e pH ótimos (Alonso, 2001) e a

estabilidade da atividade enzimática em função da temperatura e do pH bem como durante seu armazenamento a baixas temperaturas.

Alguns trabalhos apresentados na literatura demonstram que as faixas de atuação de lipases em função do pH e da temperatura podem variar de acordo, principalmente, com o microrganismo utilizado, tornando esta etapa fundamental após a otimização da produção de determinada lipase.

Neste sentido, Shu *et al.* (2006) estudando a caracterização de lipase de *Antrodia cinnamomea* encontraram uma temperatura ótima de 45°C e pH de 8,0. Martins (2001) determinou como ótima a mesma temperatura e pH de 9,0 para lipase de *Yarrowia lipolytica*. Pastore *et al.* (2003) determinaram 40°C e pH entre 6,0 e 6,5 como sendo a temperatura e o pH ótimos em seu estudo da caracterização de lipase de *Rhizopus* sp. Pinheiro (2006), estudando a caracterização de lipase de *Penicillium verrucosum*, determinou como temperatura ótima 44°C e pH ótimo de 7,0. Benjamin e Pandey (2000) relataram que uma das três formas de distintas lipases produzidas por *Candida rugosa* apresentou atividade ótima em pH 7,0 e temperatura de 40°C.

2.8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como pôde ser observado na revisão da literatura apresentada, as lipases de origem microbiana apresentam um grande potencial de aplicações biotecnológicas.

O conhecimento das características da lipase produzida como condições de extração, pH e temperaturas ótimas de atuação e estabilidade quando armazenadas a baixas temperaturas são de extrema importância para determinar suas possíveis aplicações.

A concentração da lipase é utilizada como uma etapa inicial de isolamento, sendo a concentração com sulfato de amônio a mais utilizada, para posteriormente purificar e/ou imobilizar as enzimas em suportes de material insolúvel como resina polimérica (Accurel EP100) e Carvão Ativo pelo processo de

adsorção, obtendo-se assim enzimas mais estáveis, facilitando sua recuperação e reutilização.

Portanto, é de grande valia, após a otimização do processo de produção, o estudo das condições de extração, concentração, caracterização e imobilização da lipase produzida. Com base nestes aspectos, à lacuna encontrada na literatura e vislumbrando a aplicação industrial da lipase de *Penicillium verrucosum* produzida por FES utilizando farelo de soja como substrato, o presente trabalho teve por objetivo geral investigar estas importantes etapas de processo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais, procedimentos experimentais e a metodologia analítica utilizados para o desenvolvimento do estudo relacionado à otimização da extração, concentração, imobilização e caracterização parcial da lipase produzida por FES utilizando *P. verrucosum*.

3.1. MATERIAIS

Os principais reagentes, meios de cultura e suportes para a imobilização da lipase utilizados no decorrer deste trabalho foram:

- Acetona (Quimex);
- Ácido Clorídrico 37% (Quimex);
- Ácido Fosfórico 85% (Nuclear);
- Acetonitrila (Vetec);
- Accurel EP 100 (Nortec);
- Biftalato de Potássio (Nuclear);
- Brilliant Blue (Laomasi Brilhante Blue) (Sigma);
- Carvão Ativo (ANF – Carvorite);
- CaCl_2 (Nuclear);
- Etanol 95% (Quimex);
- Farelo de Soja (Olfar);
- Fenolftaleína (Nuclear);
- Fosfato de Sódio Monobásico (Vetec);
- Fosfato de Sódio Bibásico (Vetec);
- Goma Arábica (Synth);
- Hidróxido de Sódio (Nuclear);
- Meio PDA (Composição após o preparo (39 g em 1 L): 4 g/L de infusão de batata, 20 g/L de glicose e 15 g/L de ágar) (Acumedia);
- Membranas de Diálise (Inlab);
- Metanol seco (Max. 0,005% H_2O) (Merck);

- Óleo de Oliva (Arisco);
- Sulfato de Amônio (Synth);
- Solução de Karl Fisher (CombiTitrant 5) (Merck);
- Tween 80 (Vetec);
- Tris-HCl (Tris (hydroxymethyl-aminomethan) (Merck);
- p-nitrofenol (Merck);
- p-nitrofenol butirato (Sigma).

3.2. EQUIPAMENTOS

Os principais equipamentos utilizados neste estudo foram os seguintes:

- Agitador Orbital (Marconi MA-410);
- Agitador Magnético (Fisatom);
- Banho Agitador (Nova Ética);
- Bomba a Vácuo (Marconi);
- Balança Analítica (Bel Engineering);
- Câmara de Fluxo Laminar (Pachane);
- Congelador -80°C (CFC FREE);
- Centrífugas Refrigeradas (Nova Técnica);
- Dessecador;
- Espectrofotômetro (Agilent Technologies 8453);
- Freezer Frost Free (Brastemp);
- Germinadora para Incubação (Tecnal TE-401);
- Karl Fisher (Mettler Toledo DL 50 Graphix);
- Liofilizador (Edwards);
- Mixer Manual (Black & Decker);
- Potenciômetro (Gehaka);
- Refrigerador (Brastemp).

3.3. MÉTODOS

Nesta seção será apresentada a metodologia empregada para a produção, concentração, imobilização e caracterização parcial da lipase produzida por FES utilizando *P. verrucosum*.

3.3.1. PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

3.3.1.1. Microrganismo

O fungo *Penicillium verrucosum* usado para o estudo foi isolado previamente por Freire (1996) em solo brasileiro. Este microrganismo foi pré-selecionado como bom produtor de lipases através das metodologias de seleção em meio sólido e líquido descritas na literatura (Freire, 1996). Este fungo tem sido permanentemente estocado em glicerol, sílica e meio sólido recoberto com óleo mineral sob refrigeração. A propagação de esporos para posterior fermentação foi feita por um período de 7 dias a 27,5°C.

3.3.1.2. Inóculo

O meio (Potato Dextrose Agar – PDA) para o inóculo era constituído por PDA 3,9% (m/v) e água destilada. Após a solubilização completa do componente, 100 mL de meio foram transferidos para um Erlenmeyer de 500 mL e então autoclavados a 121°C por 30 minutos.

Do tubo estoque, retirou-se uma alçada e transferiu-se para um tubo de ensaio contendo 10 mL de solução de Tween 80. Após a homogeneização retirou-se 0,30 mL contendo uma concentração de esporos de 4×10^8 esporos/g e inoculou-se nos erlenmeyers já resfriados, mantendo-se em câmara de germinação a 27,5°C por 7 dias (Vargas, 2004). O recolhimento de esporos foi feito adicionando-se 10 mL de solução Tween 80 (0,1% v/v) e pérolas de vidro estéreis ao Erlenmeyer. Retirou-se 1 mL da solução contendo esporos, este volume foi transferido para um tubo de 9 mL de solução de Tween 80 até diluição 10^{-3} podendo estes ser estocados a 4°C, no máximo, 15 dias.

3.3.1.3. Preparo dos Meios de Cultivo

O substrato utilizado em todos os experimentos de fermentação em meio sólido constituiu de farelo de soja obtido no moinho Olfar (Erechim-RS) o qual foi peneirado (Tyler 35-60) e armazenado em freezer até o momento da sua utilização, sendo que a fermentação em meio sólido foi realizada em béqueres de polipropileno de 500 mL tampados com manta acrílica, de acordo com a Figura 3.1.

Em cada béquer eram colocados 10 g de farelo de soja e a adição de 9,6mL de água por gotejamento manual com auxílio de pipeta graduada de forma que toda a área do farelo fosse recoberta obtendo-se um percentual de umidade de 50%. Os béqueres eram autoclavados a 121°C por 15 minutos e, após resfriamento, inoculava-se a suspensão de esporos previamente diluída até concentração de esporos desejada (4×10^8 esporos/g) (Pinheiro, 2006).



Figura 3.1. Béqueres utilizados para a FES do farelo de soja utilizando *Penicillium verrucosum*

3.3.1.4. Preparo das Amostras

Após 48 horas de fermentação na câmara de germinação a 27,5°C (Pinheiro, 2006) as amostras foram maceradas em câmara de fluxo e colocadas em Erlenmeyers de 250 mL a adicionados 45 mL de tampão fosfato de sódio 100

mM pH 7,0. Efetuou-se, então, a incubação em agitador orbital à temperatura de 37°C e velocidade de agitação de 150 rpm por 30 minutos. Em seguida era feita a extração da fração líquida por prensagem manual em filtro e o sobrenadante era utilizado para a dosagem da atividade de hidrólise das amostras.

3.3.1.5. Atividade de Hidrólise

Como substrato para dosagem da atividade de hidrólise foi utilizado óleo de oliva (10% m/v) emulsionado com goma arábica (5% m/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. Para a medida da atividade de hidrólise nas etapas da otimização da extração e estabilidade do extrato bruto e da torta em temperatura de congelamento, à 18 mL desta emulsão contidos em Erlenmeyers de 125 mL foram adicionados 2 mL da amostra. Já para a medida da atividade nas etapas de concentração, estabilidade do extrato concentrado precipitado em temperatura de congelamento e caracterização em termos de pH e temperatura ótimos a 20 mL desta emulsão foram adicionados 0,10 g de amostra.

Após este procedimento, o meio reacional era incubado por 15 minutos a 37°C e 150 rpm e, a seguir a reação era interrompida e os ácidos graxos extraídos pela adição de 20 mL de uma solução de acetona/etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos eram, então, titulados com uma solução de NaOH (0,05 M) até pH 11.

Os brancos reacionais eram preparados colocando-se acetona/etanol após a incubação em agitador orbital e então se acrescentava os 2 mL ou 0,1 g de amostra, realizando-se, em seguida, a titulação. As dosagens da atividade foram feitas em duplicata e a média aritmética dos valores encontrados foi utilizada para o cálculo da atividade de hidrólise.

Uma unidade de atividade hidrolítica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1mmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas acima, podendo ser determinada através da Equação 3.1 (Leal, 2000).

$$A = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 1000}{t \cdot V_c} \quad (3.1)$$

onde:

A= Atividade de hidrólise (U/mL ou U/g de substrato);

Va= Volume da amostra titulada (mL);

Vb= Volume do branco titulado (mL);

Vc= Volume da amostra usada na reação (mL) ou massa de amostra utilizada na reação (g);

t= Tempo de reação (minutos);

M= Molaridade da solução de NaOH.

3.3.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

Na determinação das condições de extração da lipase produzida por *Penicillium verrucosum* em FES, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 com dois pontos axiais para cada variável independente e triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos. As faixas de pH e temperatura estudadas são apresentadas na Tabela 3.1. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados referem-se à média aritmética dos mesmos.

Tabela 3.1. Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^2 para otimização das condições de extração.

Variáveis/Níveis	Temperatura	pH
-1,41	30	4,88
-1	32	5,50
0	37	7,00
1	42	8,50
1,41	44	9,11

Para a realização da extração, a torta de soja fermentada era colocada em Erlenmeyers e eram adicionados 45 mL de tampão fosfato de sódio com pH pré-estabelecido no planejamento de experimentos. Os frascos permaneciam em

agitador orbital por 30 minutos a 150 rpm nas temperaturas também avaliadas segundo metodologia de planejamento experimental, sendo efetuada após este procedimento, a medida da atividade de hidrólise, como descrito anteriormente.

3.3.3. CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

3.3.3.1. Precipitação com sulfato de amônio

Para a determinação da melhor condição de concentração do extrato enzimático, foram realizados planejamentos experimentais fatoriais completos 2^2 seqüenciais, onde foram estudados a saturação do sulfato de amônio (%) e o tempo de precipitação, conforme apresentados nas Tabelas 3.2 e 3.3.

Tabela 3.2. Variáveis e níveis estudados no primeiro planejamento fatorial completo 2^2 para a concentração do extrato enzimático obtido por *P. verrucosum*.

Variáveis/Níveis	% saturação	Tempo (h)
-1	40	6
0	70	10
1	100	14

Tabela 3.3. Variáveis e níveis estudados no segundo planejamento fatorial completo 2^2 para a concentração do extrato enzimático obtido por *P. verrucosum*.

Níveis	% saturação	Tempo (h)
-1,41	32	5
-1	40	6
0	60	9
1	80	12
1,41	88	13

Após otimizada a condição de extração, 150 mL deste extrato enzimático foi colocado em béqueres de 500 mL e acrescentou-se sulfato de amônio até a saturação desejada, determinada no planejamento experimental. Esta etapa foi realizada em agitador magnético em banho de gelo (4°C) com controle de pH (7,0) ajustado com adição de NaOH 20% até completa dissolução do sal.

O extrato era então colocado em tubos de centrífuga e permanecia pelo tempo determinado no planejamento a -10°C para a precipitação da amostra.

Decorrido este tempo de precipitação, as amostras eram então centrifugadas a 4°C, 8000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante era descartado e o precipitado removido com quantidade mínima de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 (Shu *et al.*, 2006).

As amostras foram então congeladas a -80°C e liofilizadas por 12 horas até peso constante. Estas foram armazenadas em geladeira para posterior medida de atividade hidrolítica e proteína pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Para a determinação de proteínas pelo método de Bradford era utilizado Reagente de Bradford e uma curva padrão de albumina (1 mg/mL) em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,5, preparado conforme descrito no Anexo I.

Para a medida de proteína eram utilizadas diversas diluições: amostra bruta, 3X, 5X, 10X e 25X, as quais eram lidas em espectrofotômetro a 595 nm.

Para cada diluição era pesada uma amostra de aproximadamente 4 mg de sólido. A amostra era diluída em 200 µL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 e deste, então, retirados os 100 µL utilizados para a leitura de absorbância, sendo que a concentração de proteína era calculada conforme Equação 3.5:

$$[]_{prt.} = \frac{Abs.}{fator} \cdot 10 \cdot d \quad (3.5)$$

onde:

[] prt= Concentração de proteína (mg prot./mL);

Abs= Absorbância lida nas amostras a 595nm;

d= Diluição das amostras;

fator = valor obtido na curva de calibração.

3.3.3.2. Diálise do Extrato Enzimático Concentrado

Após a concentração das amostras foi realizada a diálise das mesmas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0 por 24 horas utilizando membranas de diálise 33X21 mm, previamente preparadas conforme descrito no Anexo II.

Com o intuito de verificar alguns parâmetros desta etapa, foram realizados experimentos adicionando CaCl_2 nas concentrações de 0%, 0,5%, 1%, 5% e 10% ao tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0, substituição do tampão Tris-HCl por tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0, sendo que estes permaneceram por 24 horas em temperatura ambiente e sob refrigeração.

Decorridas as 24 horas, as amostras foram congeladas a -80°C e posteriormente liofilizadas e, então, era medida a atividade de hidrólise, conforme metodologia descrita anteriormente.

3.3.4. IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES CONCENTRADAS

O extrato concentrado na condição maximizada foi imobilizado utilizando o princípio de adsorção. Neste sentido, dois suportes foram utilizados, resina polimérica (Accurel EP 100) e Carvão Ativo, cuja ficha técnica é apresentada no Anexo III.

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

Aos suportes previamente preparados adicionou-se 50 mL de uma solução enzimática contendo 3 g de enzima precipitada em 60 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, a qual foi mantida sob agitação magnética em temperatura de 5°C (banho de gelo) por 2 horas. Esta metodologia foi definida após ensaios preliminares nos quais verificou-se que para a imobilização do extrato enzimático

era necessária uma atividade específica mínima para garantir a eficiência da adsorção.

Em tempos de 0, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 minutos foram retiradas alíquotas de 250 µL para posterior medida de proteína e construção de um gráfico do teor de proteína em função do tempo de reação e cálculo do rendimento da imobilização, de acordo com a Equação 3.4. A medida de proteína foi feita pelo método de Bradford, conforme descrito anteriormente.

Foram medidas também as atividades de hidrólise da solução de entrada e solução de saída, conforme metodologia descrita a seguir, e cálculo da retenção durante a imobilização através das Equações 3.5 e 3.6.

$$\eta(\%) = \frac{P_s}{P_o} \times 100 \quad (3.4)$$

onde:

η = Rendimento (%);

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

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

$$Ra(\%) = \frac{A_s \times 100}{A_r} \quad (3.5)$$

onde:

Ra = Retenção (%);

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

A_r = Atividade Teórica (U) (Equação 3.6).

$$A_r = A_e - A_s \quad (3.6)$$

onde:

Ae= Atividade de entrada (U);

As= Atividade de saída (U).

Após o término do processo de adsorção, as amostras foram filtradas a vácuo e permaneceram por 48 horas em dessecador. Em seguida, foram medidas a atividade de hidrólise das enzimas imobilizadas e o conteúdo de água das mesmas por aparelho Karl Fisher. Foi medida também a proteína da solução de entrada e de saída e da enzima imobilizada pelo método de Bradford, sendo que foi acrescentada 0,1% de amostra para a enzima imobilizada com Carvão Ativo e 2% para a imobilizada em resina polimérica (Accurel EP 100) em relação ao total de reagente utilizado para a análise. Estas concentrações foram determinadas em testes preliminares realizados.

A metodologia utilizada para medida da atividade de hidrólise da enzima imobilizada baseou-se na formação de um produto cromóforo (p-nitro fenol) a partir da reação de hidrólise do p-nitrofenil butirato catalisada por lipases. A utilização deste método deveu-se ao fato da necessidade de um método com maior sensibilidade de detecção da atividade hidrolítica das amostras (Bastida *et al.*, 1998).

Para a determinação da atividade de hidrólise por este método primeiramente foi construída uma curva de calibração a partir do p-nitrofenol, conforme Anexo IV. Como substrato para a medida da atividade de hidrólise foi utilizado reagente p-nitrofenol – butirato, preparado conforme descrito no Anexo IV.

A reação se processou em banho agitado à 37°C e 150 rpm, no qual eram colocados tubos de ensaio contendo 1,968 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM mais 16 µL de p-nitrofenol–butirato e, após, eram acrescentados 16 µL de extrato enzimático. O meio reacional permaneceu nestas condições por 0, 1, 2, 3, 5, 7 e 10 minutos. Decorrido o tempo de reação, as amostras eram colocadas na cubeta e feita a leitura em espectrofotômetro à 348 nm. Para as enzimas imobilizadas eram acrescentadas 1% m/v de extrato enzimático, de acordo com testes preliminares.

Após realizadas as leituras foram construídos gráficos da absorbância em função do tempo de reação para obtenção do fator da curva a ser utilizado para o cálculo da atividade de hidrólise, conforme Equação 3.7.

$$A = \frac{(F \cdot VF \cdot 1000)}{(CC \cdot VA)} \quad (3.7)$$

onde:

A= Atividade de hidrólise (U);

F= Fator da curva obtido do gráfico ABS com tempo;

VF= Volume total (amostra + tampão + substrato) (2mL);

CC= Coeficiente da curva de Calibração;

VA= Volume da Alíquota (substrato).

A partir dos valores de atividade de hidrólise e proteína das amostras foi calculada a atividade específica do extrato enzimático imobilizado, conforme Equação 3.8.

$$Ae = \frac{AH}{P} \quad (3.8)$$

onde:

Ae= Atividade específica (U/ mg de proteína);

AH= Atividade de hidrólise (U);

P= Proteína (mg de proteína).

3.3.5. CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LIPASE DE *Penicillium verrucosum*

A caracterização das enzimas (extrato bruto, extrato concentrado, enzima purificada ou enzima imobilizada) é de suma importância para o estabelecimento das condições de aplicação, como temperatura e pH ótimos e a estabilidade da atividade enzimática durante seu armazenamento a baixas temperaturas, uma vez que tais condições podem ter uma grande variação de acordo com o microrganismo e os meios de produção utilizados.

3.3.5.1. Temperatura e pH ótimos do extrato enzimático concentrado

A caracterização parcial do extrato bruto obtido por *Penicillium verrucosum* em FES em termos de temperatura e pH ótimos foi definida anteriormente por Pinheiro (2006).

Na determinação dos valores ótimos de pH e temperatura para a atividade lipásica do extrato enzimático concentrado, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 com dois pontos axiais para cada variável independente e triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos. Preparou-se a emulsão para medida da atividade lipásica em diferentes pH e as amostras foram incubadas em diferentes temperaturas por 15 min a 150 rpm em agitador orbital. As faixas de pH e temperatura estudadas estão apresentadas na Tabela 3.4. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Tabela 3.4. Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^2 para determinação do pH e temperatura ótimos.

Variáveis/Níveis	Temperatura (°C)	pH
-1,41	30	4,88
-1	32	5,50
0	37	7,00
1	42	8,50
1,41	44	9,11

3.3.5.2. Estabilidade da Torta de Soja Fermentada, do Extrato Enzimático Bruto e da Lipase Concentrada a baixas temperaturas.

Após o período de fermentação foram armazenadas amostras de 3 g da torta em congelador (-10°C) e então realizada a extração e medida de atividade de

hidrólise, como descrita anteriormente, nos tempos 0, 48 h e a cada 7 dias, a fim de acompanhar a estabilidade da atividade da enzima.

Para a determinação da estabilidade do extrato enzimático este foi extraído segundo metodologia descrita anteriormente e, então, separadas amostras de 10 mL, sendo a atividade medida nos tempos estudados para a torta fermentada.

Após a concentração da enzima com sulfato de amônio na condição maximizada, os extratos foram armazenados (amostras de 0,1 g) à temperatura de 4°C e -10°C, sendo medida a atividade de hidrólise (como descrito anteriormente) nos tempos 0, 48 h e a cada 7 dias, a fim de acompanhar a estabilidade da atividade da lipase concentrada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo dos processos de otimização da extração, precipitação com sulfato de amônio, imobilização com os diferentes agentes imobilizantes, bem como caracterização parcial e estabilidade em temperatura de congelamento dos extratos enzimáticos obtidos a partir de *Penicillium verrucosum* por fermentação em estado sólido.

4.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DA LIPASE

Nesta etapa, avaliou-se o efeito da temperatura e do pH na extração da lipase produzida por fermentação em estado sólido, sendo o conhecimento destas variáveis de grande importância na determinação das condições de operação em possíveis aplicações desta enzima. Foi utilizado um planejamento fatorial completo com pontos axiais para verificação dos efeitos de primeira e segunda ordem bem como as interações entre as variáveis. A Tabela 4.1 apresenta a matriz do planejamento com os valores reais, codificados e as respostas para a atividade lipásica.

Verifica-se que as maiores atividades enzimáticas encontradas nesta etapa do estudo estão no ensaio correspondente ao ponto central (temperatura de 37°C e pH 7,0), a qual ficou em torno de 4 U/mL.

As condições encontradas como ótimas para a extração de lipases produzidas por *Penicillium verrucosum* em FES neste trabalho são semelhantes às aquelas utilizadas por Palma *et al.* (2000) e Gombert *et al.* (1999) para a extração de lipase de *Penicillium restrictum* utilizando torta de babaçu como substrato e por Pinheiro (2006) na extração de lipase de *Penicillium verrucosum* utilizando farelo de soja como substrato. Cavalcanti *et al.* (2005) utilizaram pH 7,0 e temperatura de 35°C para a extração de lipases de *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de babaçu como substrato. É importante salientar que em todos os trabalhos citados as condições de extração não foram estudadas de maneira sistemática,

como foi conduzida neste trabalho. Os valores citados anteriormente referem-se à condições utilizadas na extração.

Tabela 4.1. Matriz do planejamento experimental realizado (valores codificados e reais com as respostas da atividade lipásica) para extração da lipase de *P. verrucosum*.

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Atividade Lipásica (U/mL)
1	-1 (32)	-1 (5,5)	1,20
2	+1 (42)	-1 (5,5)	3,40
3	-1 (32)	+1 (8,5)	3,40
4	+1 (42)	+1 (8,5)	2,80
5*	0 (37)	0 (7,0)	3,75
6*	0 (37)	0 (7,0)	4,06
7*	0 (37)	0 (7,0)	4,37
8	0 (37)	-1,41 (4,9)	0,41
9	0 (37)	+1,41 (9,1)	1,88
10	-1,41 (29,9)	0 (7,0)	1,80
11	+1,41 (44,1)	0 (7,0)	1,72

* Ponto central

Os resultados encontrados representam condições ótimas de atuação para a maioria das enzimas, bem como condições amenas o que favorecerá a manutenção da atividade enzimática quando submetida aos processos industriais.

Os resultados apresentados na Tabela 4.1 foram tratados estatisticamente e um modelo empírico foi obtido (Equação 4.1). O modelo codificado otimizado para a extração da enzima em função da temperatura e do pH foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 4.2. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (0,95) e o valor de F (F calculado maior que o F tabelado) validaram estatisticamente o modelo ($p < 0,05$) e permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 4.1.

$$\text{Atividade lipásica (U / mL)} = 4,1 - 0,46 \text{ pH} - 1,14 \text{ pH}^2 - 0,83 \text{ T}^2 - 0,7 \text{ pH T} \quad (4.1)$$

Tabela 4.2. Análise de variância para a atividade lipásica do extrato enzimático bruto obtido por *Penicillium verrucosum*.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	12,56	4	3,14	4,66
Resíduo	4,04	6	0,67	
Falta de ajuste	3,85	4		
Erro puro	0,19	2		
Total	16,60	10		

Coefficiente de correlação: $R=0,87$, $F_{0,95;4;6}=4,53$

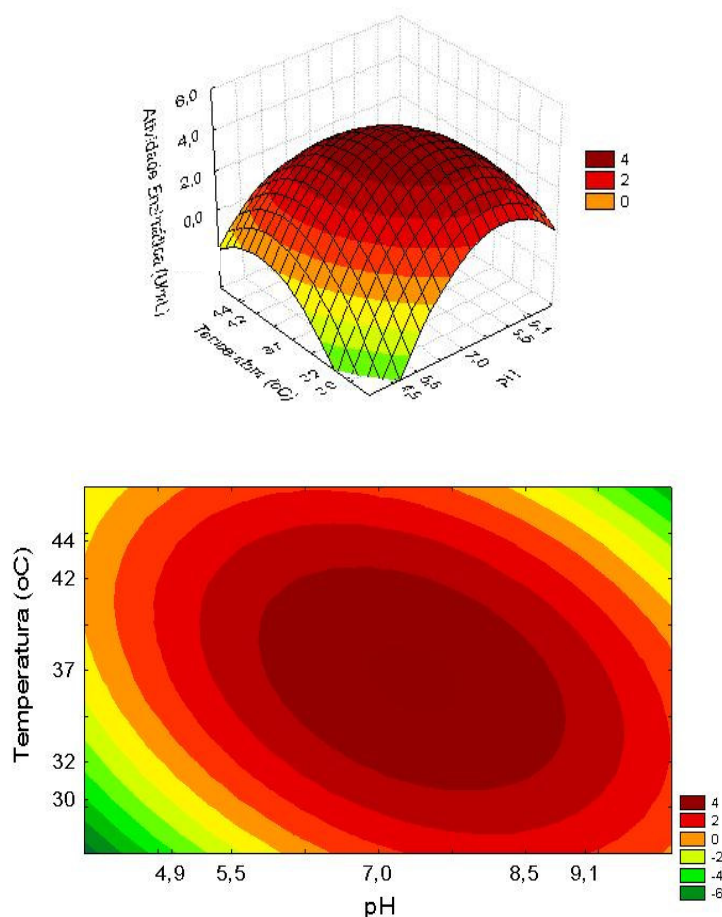


Figura 4.1. Superfície de resposta e curva de contorno para atividade lipásica obtida na otimização das condições de extração da lipase produzida por FES.

Na Figura 4.1 pode-se verificar uma região ótima compreendida entre pH 6,5 e 8,3 e temperatura de 35°C e 40°C na qual encontram-se os melhores resultados para atividade lipásica, conforme modelo matemático obtido. Observa-se também que em condições extremas, dentro da faixa investigada, de pH e temperatura tem-se uma tendência de inibição da atividade da enzima.

Esta região ótima obtida é de extrema importância do ponto de vista de aplicação industrial, pois permite que a extração seja realizada em uma faixa de pH e temperatura permitindo oscilações do processo em termos destas variáveis sem conseqüências na atividade enzimática. Estes resultados devem ser novamente confrontados com a literatura para que seja salientada a importância de um estudo sistemático frente ao uso direto de condições fixas de extração. Para cada enzima, dependendo do microrganismo, substrato e condições de produção utilizadas, uma diferente faixa ótima de extração será obtida. Porém, a grande importância deste estudo refere-se a mostrar uma metodologia para definir condições de extração, a qual pode ser usada para outras condições, enzimas e substratos.

4.2. CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

Na precipitação com sulfato de amônio ocorre a concentração das enzimas, o que facilitará a posterior imobilização destas. A determinação da melhor condição de precipitação da lipase produzida por *Penicillium verrucosum* foi avaliada através da realização de um planejamento fatorial 2^2 completo, sendo a matriz do planejamento experimental bem como os resultados de atividade específica obtidos apresentados na Tabela 4.3.

Pode-se verificar que o ensaio 1, o qual corresponde aos menores níveis de saturação e tempo de precipitação (40% e 6 horas, respectivamente) apresentou a maior atividade específica (1,24 U/mg). Já na condição de maior saturação e tempo de precipitação (100% e 14 horas, respectivamente) observa-se perda total da atividade enzimática.

Observando os resultados relatados na literatura, verifica-se que resultados próximos foram encontrados por Benjamin e Pandey (2000) precipitando lipase de

Candida rugosa em sulfato de amônio com saturação variando de 20% a 100% (3,88 U/mg) e Kakugawa *et al.*, (2002) na precipitação de lipase de *Kurtzmanomyces sp.* I – 11 (3,52 U/mg).

Tabela 4.3. Matriz do primeiro planejamento experimental realizado (valores codificados e reais com as respostas da atividade específica) para precipitação do extrato enzimático obtido por FES utilizando *P. verrucosum*.

Ensaio	Saturação (%) (S)	Tempo (h) (t)	Atividade Específica após Precipitação (U/mg)
1	-1 (40)	-1 (6)	1,24
2	+1 (100)	-1 (6)	1,10
3	-1 (40)	+1 (14)	0,81
4	+1 (100)	+1 (14)	0,00
5*	0 (70)	0 (10)	1,03
6*	0 (70)	0 (10)	0,94
7*	0 (70)	0 (10)	0,88

* Ponto central

Atividades específicas mais altas foram encontradas por Shu *et al.* (2006) (12,7 U/mg) precipitando lipase de *Antrodia cinnamomea* com 70% de saturação. Jesus *et al.*, (1999) obtiveram 14,1 U/mg com 80% de saturação na precipitação de lipases de *Penicillium restrictum* e Kanwar *et al.*, (2002), precipitando lipase de *Pseudomonas* com 60% de saturação, atingiram uma atividade máxima de 19,46 U/mg. Sharma *et al.*, (2002) obtiveram 44,82 U/mg na precipitação de lipases de *Bacillus sp.* RSJ – 1 com 30% a 70% de saturação. Pastore *et al.*, (2003), na precipitação de lipase de *Rhizopus sp.* com 70% de saturação, alcançaram 103 U/mg. Abbas *et al.*, (2002), na precipitação de lipases de *Mucor sp.* com 75% de saturação, atingiram 129 U/mg e Bacha *et al.* (2005) encontraram 521 U/mg de atividade precipitando lipase de pâncreas de avestruz à 60% de saturação .

Observa-se, portanto, que há uma diferença significativa entre as atividades encontradas na literatura, variando de acordo com a condição experimental e o

microrganismo utilizado, o que justifica o confronto criterioso que deve ser realizado entre os resultados obtidos neste trabalho e os citados na literatura.

Os resultados apresentados na Tabela 4.3 permitiram a obtenção de um modelo codificado para a atividade específica do extrato enzimático em função da saturação e tempo, o qual está apresentado na Equação 4.2. Para verificação da validade do modelo foi realizada a análise de variância apresentada na Tabela 4.4. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (0,95) e o teste F (F calculado maior que o F tabelado) validaram estatisticamente o modelo ($p < 0,05$) e permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 4.2.

$$\text{Atividade lipásica}(U/mg) = 0,86 - 0,24S - 0,39t - 0,17St \quad (4.2)$$

Tabela 4.4. Análise de variância para a atividade lipásica do extrato enzimático concentrado obtido por *Penicillium verrucosum*.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	0,92	3	0,31	15,83
Resíduo	0,06	3	0,02	
Falta de ajuste	0,05	1		
Erro puro	0,01	2		
Total	0,98	6		

Coeficiente de correlação: $R=0,96$, $F_{0,95;3;3} = 9,27$

Através da Figura 4.2 verifica-se que, diminuindo a porcentagem de saturação e o tempo de precipitação, há uma tendência ao incremento da atividade específica obtida, o que representa redução de custos de processo devido as menores quantidades de sulfato de amônio utilizadas e menores tempos de reação. Convém salientar ainda a forte interação existente entre as duas variáveis estudadas na resposta atividade específica.

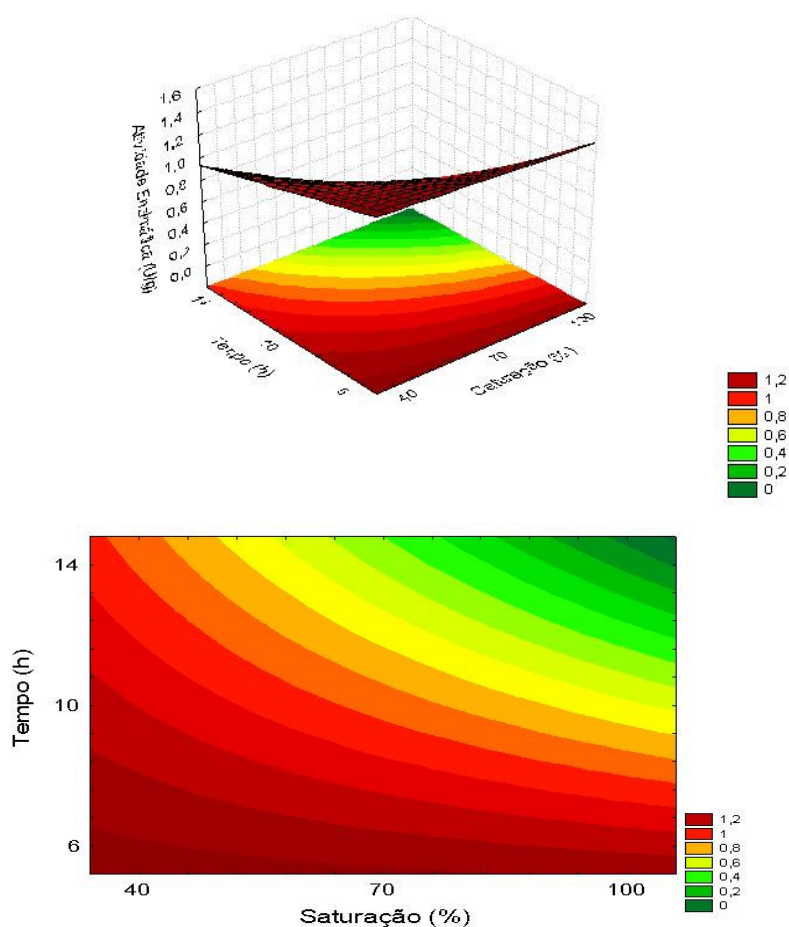


Figura 4.2. Superfície de resposta e curva de contorno para atividade lipásica obtida no estudo da condição de precipitação por sulfato de amônio por FES.

Após a precipitação foi realizada a diálise das amostras com o intuito de remover possíveis impurezas presentes na enzima concentrada. A determinação da atividade específica da lipase produzida por *Penicillium verrucosum* foi avaliada através da realização de um planejamento fatorial 2^2 completo, sendo a matriz do planejamento experimental bem como os resultados de atividade específica obtidos apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Matriz do primeiro planejamento experimental realizado (valores codificados e reais com as respostas da atividade específica) para a avaliação do efeito da diálise das lipases de *Penicillium verrucosum*.

Ensaio	Saturação (%)	Tempo (h)	Atividade Específica após Diálise (U/mg)
1	-1 (40)	-1 (6)	0,83
2	+1 (100)	-1 (6)	0,29
3	-1 (40)	+1 (14)	0,53
4	+1 (100)	+1 (14)	0,09
5*	0 (70)	0 (10)	0,69
6*	0 (70)	0 (10)	0,66
7*	0 (70)	0 (10)	-

* Ponto central

Nos resultados obtidos nos experimentos com diálise verifica-se que o ensaio 1 foi o que apresentou a maior atividade específica (0,83 U/mg) embora inferior ao maior resultado obtido no planejamento experimental realizado sem diálise (1,24 U/mg), conforme pode ser observado na Tabela 4.3. Os dados foram tratados estatisticamente e obteve-se o Gráfico de Pareto apresentado na Figura 4.3.

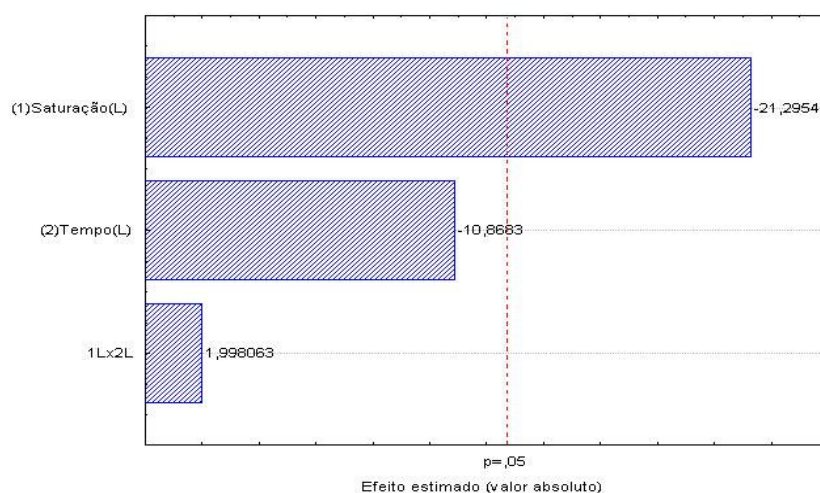


Figura 4.3. Gráfico de Pareto da precipitação do extrato enzimático produzido por FES em função das variáveis estudadas após diálise.

Observa-se que apenas a saturação apresentou efeito significativo negativo o que reforça a conclusão de que diminuindo a saturação há uma tendência a aumentar a atividade específica da enzima.

Com base nas conclusões obtidas no primeiro planejamento realizou-se um segundo planejamento de experimentos completo com pontos axiais para verificação dos efeitos de primeira e segunda ordem bem como as interações entre as variáveis para a precipitação e diálise das amostras. A matriz experimental bem como os resultados obtidos para atividade específica após precipitação estão apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Matriz do segundo planejamento experimental realizado (valores codificados e reais com as respostas da atividade específica) para precipitação do extrato enzimático.

Ensaio	Saturação (%)	Tempo (h)	Atividade Específica após Precipitação (U/mg)
1	-1 (40)	-1 (6)	0,48
2	+1 (80)	-1 (6)	0,31
3	-1 (40)	+1 (12)	0,52
4	+1 (80)	+1 (12)	0,65
5*	0 (60)	0 (9)	0,69
6*	0 (60)	0 (9)	0,61
7*	0 (60)	0 (9)	0,71
8	-1,41 (31,8)	0 (9)	0,63
9	+1,41 (88,2)	0 (9)	0,33
10	0 (60)	-1,41 (5)	0,91
11	0 (60)	-1,41 (13)	0,67

* Ponto central

Verifica-se pelos resultados obtidos que o ensaio 10, correspondente às condições de 60% de saturação e 5 horas de precipitação, apresentou a maior atividade específica após precipitação (0,91 U/mg). Salienta-se também que

novamente nos níveis superiores de saturação (80%) foram obtidas as menores atividades específicas. Estes resultados estão condizentes com a literatura a qual apresenta valores de 60-70% de saturação como os mais adequados para concentração da enzima produzida em diferentes substratos por diferentes microrganismos (Shu *et al.*, 2006; Kanwar, *et al.*, 2002; Sharma, *et al.*, 2002; Pastore, *et al.*, 2003).

Após análise estatística do planejamento experimental realizado não foi possível a validação de um modelo empírico que descrevesse a atividade lipásica em função das variáveis independentes estudadas. Construiu-se então o Gráfico de Pareto apresentado na Figura 4.4.

Através da Figura 4.4 verifica-se que apenas a saturação apresentou efeito significativo negativo, reforçando a conclusão de que menores concentrações de saturação resultam em maiores atividades específicas após a precipitação.

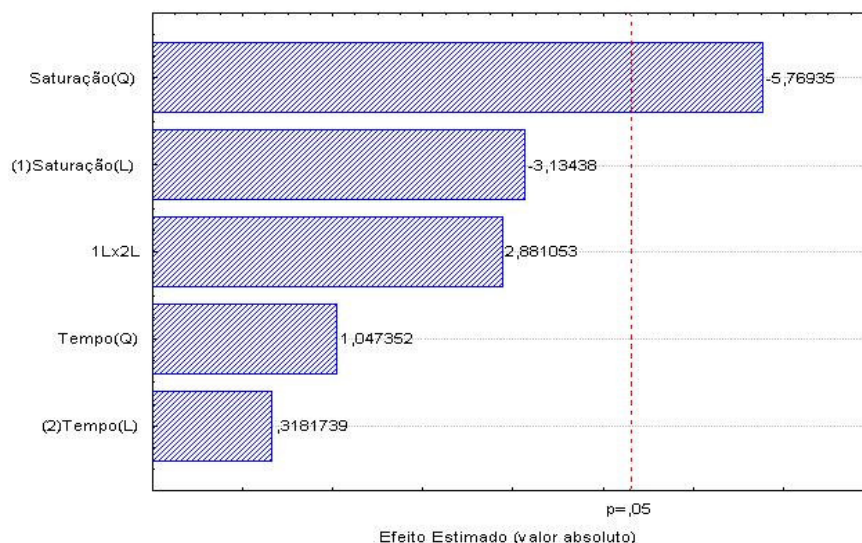


Figura 4.4. Gráfico de Pareto da precipitação do extrato enzimático produzido por FES em função das variáveis estudadas após precipitação.

Na Tabela 4.7 é apresentada a matriz experimental bem como os resultados encontrados no segundo planejamento realizado após a diálise.

Tabela 4.7. Matriz do segundo planejamento experimental realizado (valores codificados e reais com as respostas da atividade específica média) para a avaliação do efeito da diálise do extrato enzimático precipitado.

Ensaio	Saturação (%) (S)	Tempo (h) (t)	Atividade Específica após Diálise (U/mg)
1	-1 (40)	-1 (6)	0,23
2	+1 (80)	-1 (6)	0,39
3	-1 (40)	+1 (12)	0,58
4	+1 (80)	+1 (12)	0,51
5*	0 (60)	0 (9)	0,79
6*	0 (60)	0 (9)	0,63
7*	0 (60)	0 (9)	0,67
8	-1,41 (31,8)	0 (9)	0,45
9	+1,41 (88,2)	0 (9)	0,56
10	0 (60)	-1,41 (5)	0,51
11	0 (60)	-1,41 (13)	0,74

* Ponto central

Após a realização da diálise destas amostras verificou-se, pelos resultados apresentados na Tabela 4.7, que o ensaio 5, o qual corresponde ao ponto central (60% saturação e 9 horas de precipitação), foi a que apresentou a maior atividade específica (0,79 U/mg). Os resultados obtidos permitiram a obtenção de um modelo codificado para o estudo da precipitação da lipase, o qual está apresentado na Equação 4.3 em função da saturação e tempo de precipitação. O modelo foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 4.8. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (0,90) e o teste F (F calculado maior que o F tabelado) validaram estatisticamente o modelo ($p < 0,1$) e permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 4.5.

$$\text{Atividade lipásica (U / mg)} = 0,63 - 0,11S^2 + 0,10t \quad (4.3)$$

Tabela 4.8. Análise de variância para a atividade lipásica do extrato enzimático concentrado obtido por *Penicillium verrucosum*, após diálise.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	0,16	2	0,08	5,90
Resíduo	0,11	8	0,01	
Falta de ajuste	0,09	6		
Erro puro	0,01	2		
Total	0,26	10		

Coeficiente de correlação: $R=0,77$, $F_{0,90;2;8} = 3,11$

Através da Figura 4.5 observa-se que, ao contrário do caso anterior, a região compreendida entre 45% a 75% de saturação e tempos superiores a 10 horas de precipitação apresentou maiores atividades específicas após diálise, porém todos os resultados obtidos com a diálise foram menores que os obtidos sem a diálise. Convém salientar que as maiores atividades específicas somente serão obtidas em tempos superiores a 10 horas em condições intermediárias de saturação, dentro da faixa estudada.

Observa-se que os resultados encontrados no estudo da precipitação da lipase com sulfato de amônio foram menores que os reportados na literatura, porém os resultados obtidos mostraram que não havia necessidade de realização da diálise no extrato enzimático precipitado. Tendo em vista que o valor da atividade específica encontrada no primeiro planejamento sem diálise ($1,24 \pm 0,05$ U/mg) e o encontrado no segundo planejamento também sem diálise ($0,91 \pm 0,16$ U/mg) não apresentaram diferença significativa entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) optou-se por utilizar as condições do segundo planejamento (5 horas de precipitação e 60% de saturação) para dar continuidade ao presente estudo, visto que esta condição consiste em redução do tempo de precipitação.

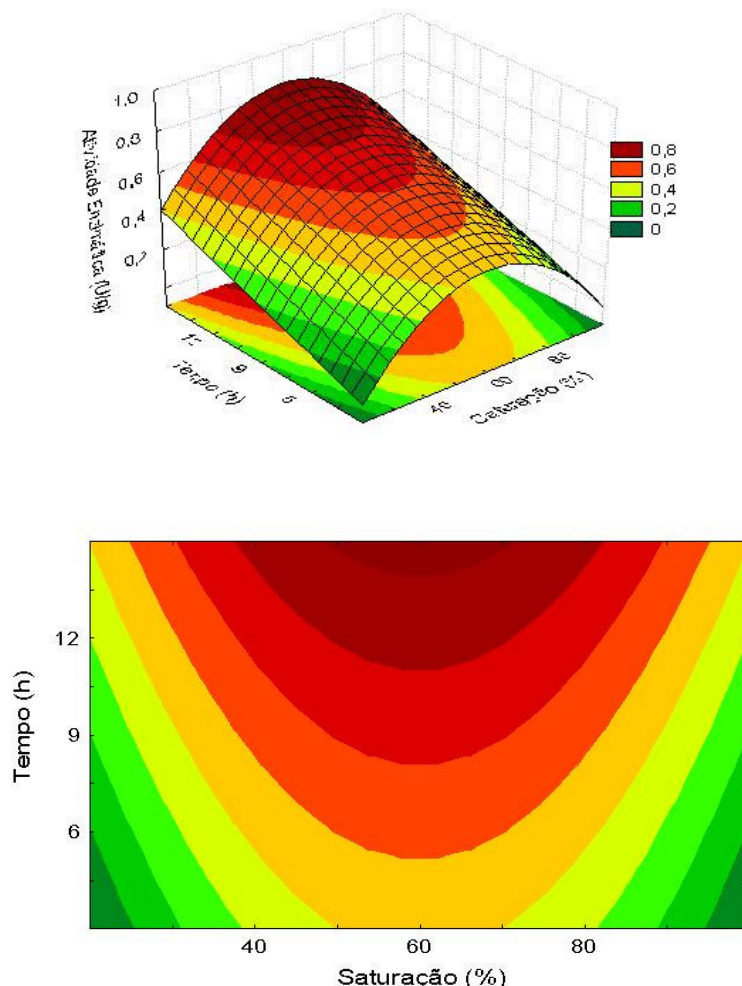


Figura 4.5. Superfície de resposta e curva de contorno para atividade lipásica obtida na precipitação da lipase produzida por FES após diálise.

Como possível explicação para o fato dos resultados encontrados para a atividade específica da enzima após a diálise em ambos planejamentos ser menor que os resultados antes da diálise, sugere-se o fato de que as lipases estariam perdendo íons cálcio de sua estrutura durante a diálise, o que provocaria a perda da atividade. Outro fator que poderia estar provocando esta queda seria o fato de a diálise ter sido realizada à temperatura ambiente. Propôs-se, então, a realização de testes adicionando ao Tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0 variadas concentrações de CaCl_2 e tampão Fosfato de Sódio 100 mM pH 7,0 em substituição ao tampão anterior, sendo os experimentos realizados a temperatura ambiente e sob refrigeração.

Os resultados foram analisados pelo Teste de Tukey e são apresentados na Tabela 4.9. Tendo em vista que as amostras apresentaram diferença significativa entre si e o maior resultado encontrado foi na amostra 2, precipitado sem diálise, confirmou-se que a condição maximizada neste estudo foi 5 horas de precipitação com sulfato de amônio a 60% de saturação, sem necessidade de diálise, podendo esta precipitação ser realizada a temperatura ambiente (25 °C).

Tabela 4.9. Médias da atividade específica da lipases de *P. verrucosum* e Desvios Padrão encontrados na análise dos resultados obtidos nos testes com diálise pelo Teste de Tukey.

Amostra	Média* (U/mg)	Desvio Padrão
1 (Extrato)	0,96 ^b	±0,04
2 (Extrato Precip.)	1,61 ^a	±0,07
3 (Fosf. de sódio)	0,49 ^c	±0,02
4 (Fosf. de sódio Geld.)	0,46 ^{c,d}	±0,02
5 (Tris- HCl)	0,47 ^{c,e}	±0,02
6 (Tris-HCl Geld.)	0,50 ^c	±0,02
7 (Tris-HCl 0,5% CaCl ₂)	0,36 ^{d,e}	±0,02
8 (Tris-HCl 0,5% CaCl ₂ Geld.)	0,14 ^g	±0,01
9 (Tris-HCl 1,0% CaCl ₂)	0,93 ^b	±0,02
10 (Tris-HCl 1,0% CaCl ₂ Geld.)	0,25 ^g	±0,02
11 (Tris-HCl 5,0% CaCl ₂)	0,00 ^h	±0,00
12 (Tris-HCl 5,0% CaCl ₂ Geld.)	0,39 ^{c,e}	±0,02
13 (Tris-HCl 10,0% CaCl ₂)	0,92 ^b	±0,04
14 (Tris-HCl 10,0% CaCl ₂ Geld.)	0,37 ^{d,e}	±0,02

* Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05),

*Geladeira (Geld).

4.3. IMOBILIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO PRODUZIDO POR FES

Os resultados obtidos na imobilização da lipase produzida por FES utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo estão apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10. Valores de Atividade Específica, Retenção, Rendimento e Conteúdo de água na imobilização da lipase produzida por FES utilizando *Penicillium verrucosum*.

	Accurel EP 100	Carvão Ativo
Atividade Específica de Entrada (U/mg de proteína)	$10,4 \times 10^3$	$10,4 \times 10^3$
Atividade Específica de Saída (U/mg de proteína)	$7,9 \times 10^3$	6×10^3
Atividade Específica Imobilizada (U/mg de proteína)	$92,4 \times 10^3$	$1,5 \times 10^6$
Retenção (Ra) (%)	368,130	382,516
Rendimento (η) (%)	11,74	30,42
Conteúdo de água (%)	5,50	10,06

Nesta tabela pode-se observar que a enzima imobilizada com Carvão Ativo apresentou melhores resultados em termos de atividade específica (1533425,5 U/mg de proteína), retenção (382,516%) e rendimento (30,42%). Estes resultados são muitos promissores, pois o Carvão Ativo tem um baixo custo e existem poucos relatos na literatura quanto ao uso deste suporte na imobilização de lipases (Kaewthong *et al.*, 2005).

Observa-se que a retenção obtida em ambos os suporte utilizados foi maior que 100%, significando que além de imobilizar, devido à afinidade da enzima pelo suporte, pode ter ocorrido uma concentração desta obtendo-se, portanto, porcentagens de retenção na ordem de 300%.

Com base nestes resultados pode-se observar que os mesmos foram maiores que alguns reportados na literatura. Kaewthong *et al.* (2005), imobilizando a lipase PS (Amano) em diferentes suportes, obteve rendimentos de 37,16% para resina polimérica (Accurel EP100, <200 μm). Quando esta mesma lipase foi imobilizada em Accurel EP 100 (200-400 μm) o rendimento encontrado foi de 31,10%, em carbonato de cálcio 0,79%, 3,56% em Celite, 6,42% em Sílica Gel e 0,36% em Carvão Ativado. Já Bryjak e Trochimczuk (2006), na imobilização de lipase de *Candida rugosa* por adsorção em suportes acrílicos, encontraram rendimento máximo de 25,4%, também menores que os encontrados no presente estudo.

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

As enzimas imobilizadas em Accurel EP100 e Carvão Ativo podem ser visualizadas na Figura 4.6.



Figura 4.6. Foto da enzima imobilizada com Accurel EP100 (direita) e Carvão Ativo (esquerda).

O estudo de imobilização de lipase produzidas por *Penicillium verrucosum* em FES mostrou-se bastante relevante do ponto de vista do baixo custo de um dos suportes utilizados (carvão ativo), bem como em função dos altos valores de retenção da enzima a este suporte.

4.4 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LIPASE

4.4.1. TEMPERATURA E pH ÓTIMOS DO EXTRATO ENZIMÁTICO CONCENTRADO

Como já citado no capítulo anterior, a caracterização parcial do extrato bruto obtido por *Penicillium verrucosum* em FES em termos de temperatura e pH ótimos foi definida anteriormente por Pinheiro (2006). Nesta etapa foram então avaliados a temperatura e pH ótimos do extrato enzimático concentrado, nas condições definidas e apresentadas anteriormente.

Para a determinação da temperatura e pH ótimos do extrato concentrado por precipitação com sulfato de amônio, foi realizado um planejamento fatorial 2^2 completo com 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, sendo a matriz do planejamento experimentos bem como os resultados de atividade lipásica apresentados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11. Matriz do planejamento experimental realizado (valores codificados e reais com as respostas da atividade lipásica) para caracterização parcial do extrato enzimático concentrado.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atividade Lipásica (U/g de sólido)
1	-1 (5,5)	-1 (32)	22,32
2	-1 (5,5)	+1 (42)	28,49
3	+1 (8,5)	-1 (32)	48,51
4	+1 (8,5)	+1 (42)	60,06
5*	0 (7,0)	0 (37)	44,93
6*	0 (7,0)	0 (37)	57,55
7*	0 (7,0)	0 (37)	41,78
8	-1,41 (4,9)	0 (37)	21,28
9	+1,41 (9,1)	0 (37)	59,12
10	0 (7,0)	-1,41 (30)	46,97
11	0 (7,0)	+1,41 (44)	40,81

* Ponto central

Observa-se que o valor máximo da atividade enzimática, 60,06 U/g, foi encontrado no ensaio 4 que corresponde a um pH de 8,5 e temperatura de 42°C, sendo possível observar também outras condições com altas atividades lipásicas. O experimento utilizando pH 9,1 e temperatura de 37 °C resultou em uma atividade de 59,12 U/g, bem como o experimento 6 que também ocasionou alta atividade (57,55 U/g) na mesma temperatura citada anteriormente porém em pH 7,0. Menores atividades enzimáticas foram obtidas nos menores pH estudados (4,9 e 5,5)

Os resultados encontrados no estudo foram semelhantes aos resultados encontrados por Shu *et al.* (2006) estudando a caracterização de lipase bruta de *Antrodia cinnamomea*, determinando como condições ótimas temperatura de 45°C e pH 8,0. Resultado semelhante também foi encontrado por Martins (2001) (45°C e pH de 9,0) para lipase bruta de *Yarrowia lipolytica*. Pinheiro (2006), estudando a caracterização do extrato bruto de *Penicillium verrucosum*, determinou como temperatura ótima 44°C e pH ótimo de 7,0.

Benjamin e Pandey (2000) relataram que uma das três formas de distintas lipases bruta produzidas por *Candida rugosa* apresentou atividade ótima em pH 7,0 e temperatura de 40°C. Pastore *et al.* (2003) determinou 40°C e pH entre 6,0 e 6,5 como sendo a temperatura e o pH ótimos em seu estudo da caracterização de lipase de *Rhizopus* sp.

A Tabela 4.12 apresenta a análise de variância para a atividade enzimática obtido nos níveis estudados. Verifica-se que o coeficiente de correlação e o F calculado permitiram a validação do modelo codificado apresentado na Equação 4.4, a qual possibilitou a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentada na Figura 4.7.

$$\text{Atividade lipásica}(U / g \text{ de sólido}) = 42,89 + 13,93pH \quad (4.4)$$

Tabela 4.12. Análise de variância para a atividade lipásica na etapa de caracterização parcial do extrato enzimático concentrado.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	1547,90	1	1547,90	36,59
Resíduo	380,66	9	42,29	
Falta de ajuste	241,36	7		
Erro puro	139,29	2		
Total	1928,56	10		

Coeficiente de correlação: $R=0,90$, $F_{0,95;1;9}=5,12$

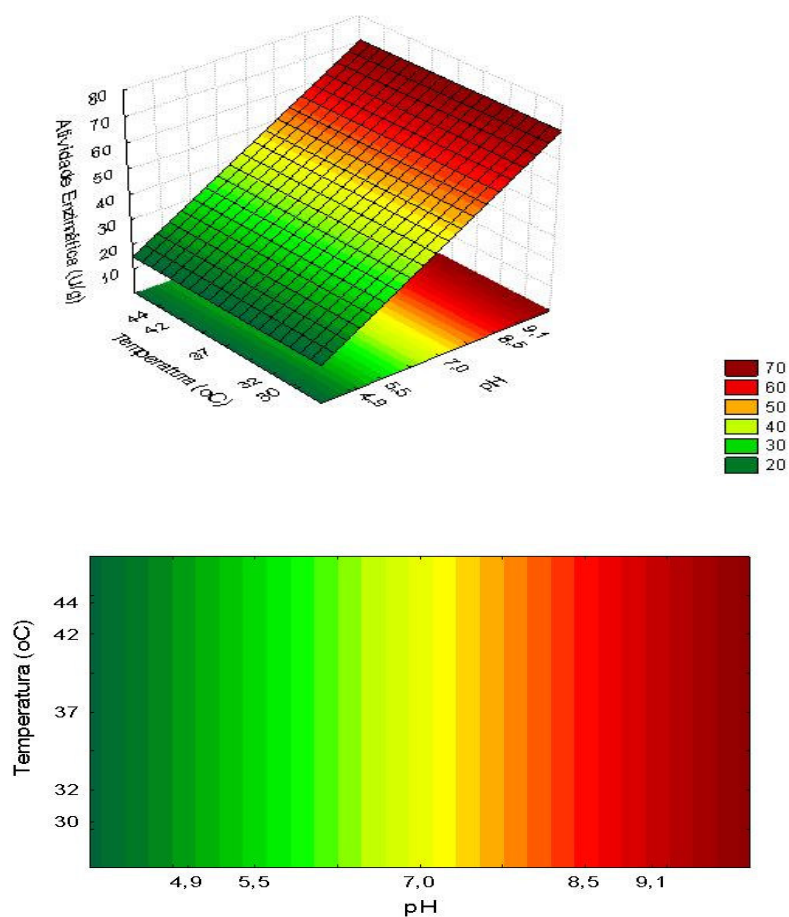


Figura 4.7. Superfície de resposta e curva de contorno para atividade lipásica obtida na avaliação da temperatura e pH ótimos para o extrato enzimático concentrado.

A Figura 4.7 mostra que a temperatura, dentro da faixa estudada, não apresenta efeito na atividade enzimática. Já em relação ao pH nota-se que maiores valores acarretam em maiores atividades enzimáticas, independente da temperatura.

Cabe salientar que, analisando de forma geral, os resultados obtidos na determinação da temperatura e pH ótimos para o extrato enzimático obtido a partir de *Penicillium verrucosum* por FES concentrado com sulfato de amônio são interessantes do ponto de vista de aplicabilidade, uma vez que a enzima mantém sua atividade em uma ampla faixa de temperatura e pH.

4.4.2 ESTABILIDADE DA TORTA DE SOJA FERMENTADA, DO EXTRATO BRUTO E DO EXTRATO CONCENTRADO ARMAZENADOS A BAIXAS TEMPERATURAS

Embora não tenham sido encontrados relatos na literatura, uma característica muito importante e que deve ser avaliada é a estabilidade da enzima quando armazenada a baixas temperaturas, pois esta influenciará no tempo que a enzima poderá ser armazenada, mantendo suas características iniciais em termos de atividade enzimática.

A seguir serão relatados os comportamentos da torta fermentada, do extrato enzimático bruto e do extrato concentrado armazenados a baixas temperaturas (-10°C). No extrato enzimático concentrado também foi avaliada a atividade enzimática em temperatura de armazenamento de 4°C.

4.4.2.1. Estabilidade da torta de soja fermentada em temperatura de congelamento

Na Figura 4.8 estão apresentados os resultados encontrados para o acompanhamento da atividade lipásica da torta de soja fermentada durante o armazenamento em congelador (-10°C) durante 200 dias.

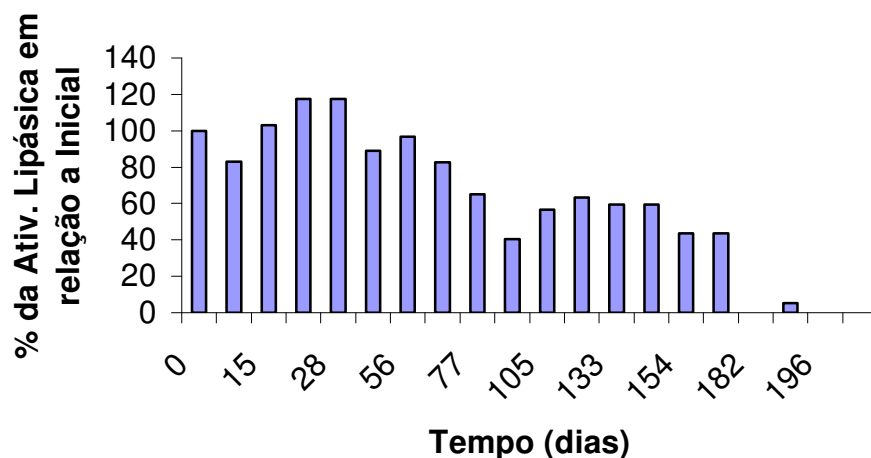


Figura 4.8. Gráfico de Barras da estabilidade da torta de soja fermentada armazenada em congelador (-10°C).

Os resultados apresentados na Figura 4.8 demonstram que a atividade lipásica da torta de soja fermentada armazenada em congelador apresentou um aumento até o 28º dia de armazenamento, diminuindo após este período, sendo que aos 196 dias era de apenas 5% e após 200 dias de armazenamento a torta fermentada perdeu toda sua atividade.

Observa-se, portanto, que a torta de soja fermentada apresentou um comportamento variável em relação à manutenção da sua atividade durante o armazenamento. É importante também frisar que a torta fermentada apresentou boa estabilidade, pois aos 56 dias de armazenamento apresentava aproximadamente 100% de atividade em relação à atividade inicial.

4.4.2.2. Estabilidade do extrato enzimático bruto em temperatura de congelamento

Os resultados encontrados para o acompanhamento da atividade lipásica do extrato enzimático bruto aquoso quando armazenado em congelador durante 218 dias estão apresentados na Figura 4.9.

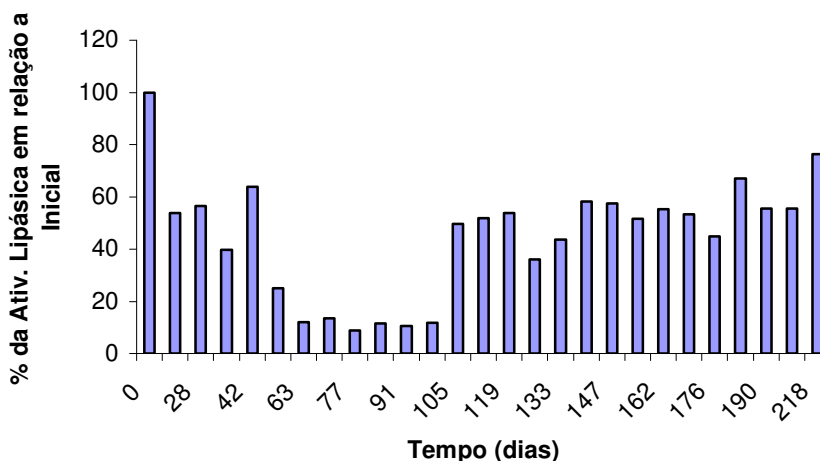


Figura 4.9. Gráfico de Barras da estabilidade do extrato enzimático bruto aquoso armazenado em congelador (-10°C).

Através da análise da Figura 4.9 verifica-se que a atividade lipásica do extrato enzimático bruto diminuiu até o 98º dia de armazenamento. Após este período a atividade aumentou, sendo este aumento mantido durante os demais dias de armazenamento. Este aumento pode ser explicado pelo fato de que algumas enzimas são capazes de se regenerar.

Cabe salientar que o extrato bruto enzimático apresentou uma boa estabilidade, pois ao 218 dias de armazenamento apresentou 80% da atividade lipásica em relação à atividade inicial.

4.4.2.3. Estabilidade do extrato enzimático concentrado armazenado em geladeira

A estabilidade da atividade lipásica do extrato enzimático concentrado armazenado em geladeira foi acompanhado durante 91 dias. Os resultados encontrados estão apresentados na Figura 4.10.

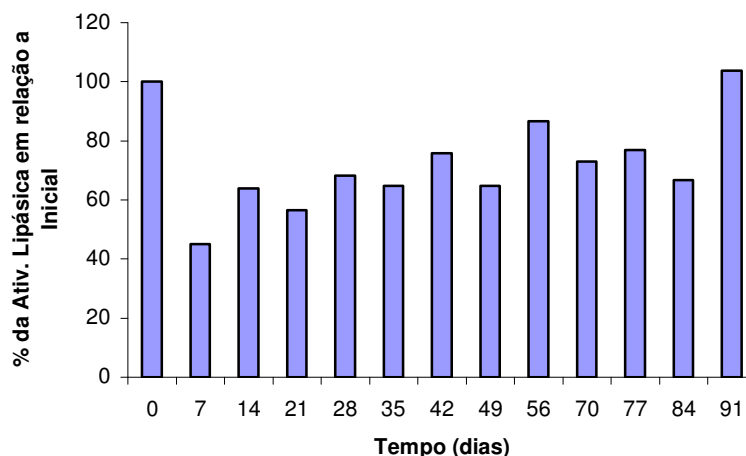


Figura 4.10. Gráfico de Barras da estabilidade do extrato enzimático concentrado armazenado em geladeira (4°C).

Observa-se por esta figura que ocorreu um decréscimo (65%) na atividade lipásica aos 7 dias de armazenamento em relação à atividade inicial e logo após, um aumento foi observado, mantendo 64% da atividade em relação à atividade inicial, índice mantido praticamente constante durante os demais dias de armazenamento.

Após 91 dias de armazenamento em geladeira, pode-se observar que o extrato enzimático concentrado manteve 100% de sua atividade original. Cabe salientar que o estudo, em função dos resultados obtidos encontra-se ainda em andamento.

4.4.2.4. Estabilidade do extrato enzimático concentrado armazenado em congelador

Os resultados encontrados para o acompanhamento da atividade lipásica do extrato concentrado armazenado em congelador durante 91 dias estão apresentados na Figura 4.11.

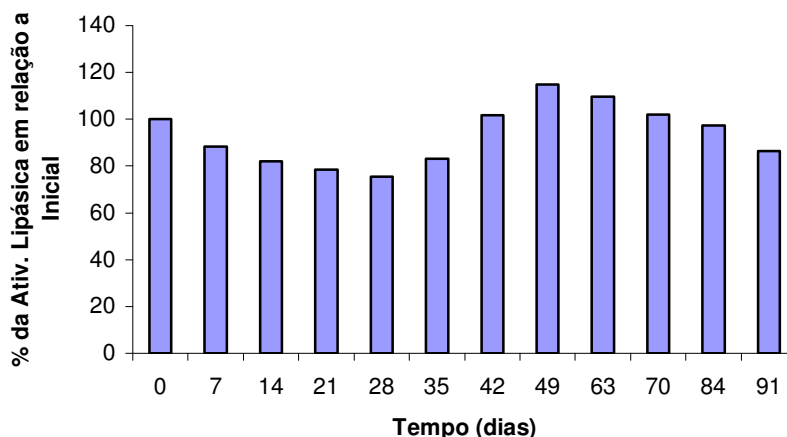


Figura 4.11. Gráfico de Barras da estabilidade do extrato enzimático concentrado armazenado em congelador (-10°C).

Pela análise desta figura pode-se observar que a atividade do extrato enzimático concentrado armazenado em congelador teve uma pequena queda até o 28º dia de armazenamento (25%), aumentando do 35º ao 49º dia, diminuindo novamente após este período até 91º dia de armazenamento.

Em comparação com o extrato concentrado armazenado em geladeira pode-se concluir que não houve uma grande diferença entre o comportamento apresentado por ambos. As duas formas de armazenamento apresentaram, em alguns momentos, diminuição da atividade e, em outros, aumento da atividade sendo que ao final mantiveram índices semelhantes ao da atividade inicial. Mais uma vez cabe salientar a necessidade de um acompanhamento por um período de tempo maior para poder se estabelecer o tempo que o extrato enzimático concentrado mantém-se estável e, conseqüentemente, suas características iniciais permaneçam constantes, em termos de atividade de hidrólise.

Como considerações finais em relação ao estudo de estabilidade conclui-se que a torta fermentada pode ser armazenada em temperatura de congelamento até 56 dias sem perda de atividade de hidrólise. Já o extrato bruto apresentou um comportamento bastante distinto ao da torta, pois houve um aumento de atividade ao final do período de acompanhamento, indicando possibilidade de armazenamento deste em temperatura de congelamento até 218 dias.

Capítulo 4– Resultados e Discussão

O estudo realizado com o extrato enzimático concentrado em geladeira e congelador indicou que tanto a 4°C como a -10°C a atividade de hidrólise é praticamente a mesma da inicial após 91 dias.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 CONCLUSÕES

Após a realização deste estudo pode-se concluir que:

- A metodologia de planejamento de experimentos mostrou-se útil na otimização da extração da lipase produzida por *Penicillium verrucosum* em FES. A condição otimizada foi usando tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0 e temperatura de 37°C atingindo-se uma atividade de 4 U/mL.
- No estudo da concentração do extrato enzimático com sulfato de amônio a condição de 60% de saturação por um período de 5 horas de precipitação foi escolhida como maximizada após a realização de dois planejamentos experimentais seqüenciais.
- Nos experimentos realizados com diálise não foi observada diferença significativa entre as amostras, optando-se por não realizar esta após a concentração do extrato enzimático.
- Na imobilização do extrato enzimático concentrado de *Penicillium verrucosum* obtido por FES os melhores resultados foram encontrados quando este foi imobilizado em Carvão Ativo, sendo que, neste caso, para este a atividade específica foi de $1,53 \times 10^6$ U/mg de proteína, rendimento de 30,42% e retenção de 382,516%.
- Após a realização de um planejamento de experimentos para caracterização parcial do extrato enzimático concentrado em termos de temperatura e pH ótimos a máxima atividade atingida foi de 60,06 U/g na temperatura de 42°C e pH 8,5.
- Em relação ao estudo de estabilidade conclui-se que a torta fermentada pode ser armazenada em temperatura de congelamento até 56 dias sem perda de atividade de hidrólise.
- O extrato bruto apresentou um comportamento bastante distinto ao da torta de soja pois houve um aumento de atividade ao final do período de

acompanhamento, indicando possibilidade de armazenamento deste em temperatura de congelamento até 218 dias.

- O estudo realizado com o extrato enzimático concentrado em geladeira e congelador indicou que tanto à 4 °C como a -10 °C a atividade de hidrólise é praticamente a mesma da inicial após 91 dias.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos neste trabalho sugere-se para trabalhos futuros:

- Caracterização parcial (temperatura e pH ótimos e de estabilidade e estabilidade a baixas temperaturas) da enzima imobilizada;
- Teste de imobilização com outros suportes;
- Aprimoramento da metodologia de medida de atividade da enzima imobilizada testando, por exemplo, o uso de inibidores de reação.
- Avaliação da atividade de quiralidade do extrato enzimático livre e imobilizado.
- Acompanhamento da atividade hidrolítica do extrato enzimático submetido à alta pressões.
- Purificação do extrato enzimático concentrado.
- Aplicação do extrato enzimático livre e imobilizado em reações de interesse.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H.; HIOL, A.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 968-975, 2002.

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

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

BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISÁN, J. M. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorptions on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol. And Bioeng.* v. 58, n 5 p. 486-493, 1998.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 44, p. 213-221, 2000.

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

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRYJAK, J.; TROCHIMCZUK, A. W. Immobilization of penicillin acylase on hydrophobic acrylic carriers. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 4, p. 573-578, 2006.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A. P.; MARASSI, M.; SILDA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.; MACEDO, G. A. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Química Nova*, v. 28, n.4, 2005.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. Production and extration of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v. 71, p. 45-50, 2000.

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

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

CORDOVA, J.; NENMAOWI, M.; ISMAILI-ALAOUI, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJLALI, B. Lipases production by solid state fermentation of oolive cake and sugar cane bagasse. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.5, p75-78, 1998.

COSTA, M. A.; PERALTA, R. M. Production of lipase by soil fung and partial characterization of lipase from a selected strain (*Penicillium wortmanii*). *J. basic microbial.*, v. 39, p. 11-15, 1999.

DAI, D.; XIA, L. Enhanced Production of *Penicillium expansum* PED-03 Lipase through Control of Culture Conditions and Application of the Crude Enzyme in Kinetic Resolution of Racemic Allethrolone. *Biotechnol. Prog*, v. 21, p.1165-1168, 2005.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, n4, 2004.

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

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

FREIRE, D. M. G. Seleção de Microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipases por *Penicillium restrictum*. Rio de Janeiro:1996. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica, IQ/UFRJ.

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

GERVAIS, P. ,and MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemistry Engineering Journal*, v. 13, p. 85-101, 2003.

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

Capítulo 6– Referências Bibliográficas

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

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

KAEWTHONG, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; H-KITTIKUN, A. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1525-1530, 2005.

KAKUGAWA, K.; SHOBAYASHI, M.; SUZUKI, O.; MIYAKAWA, T. Purification and characterization of a lipase from the glycolipid-producing yeast *Kurtzmanomyces* sp. I-11. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 66, n 5, p. 978-985, 2002.

KANWAR, L.; KUMAR, B.; GOSWAMI, P. Production of a *Pseudomonas* in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. *Bioresource Technology*, v. 84, p. 207-211, 2002.

KNEZEVIC, Z.; BOBIC, S.; MILUTINOVIC, A.; OBRADOVIC, B.; MOJOVIC, L.; BUGARSKI, B. Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in leithin/isooctane system. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 313-318, 2002.

KOBLITZ, M. G. B. Purificação de lipase de *Rhizopus* sp e sua aplicação na síntese de monoacilglicérolis. São Paulo: 2003. Tese de Doutorado. UNICAMP.

LEAL, M. C. M. R. Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios. Rio de Janeiro: 2000. Tese de mestrado. Programa de Engenharia Química da COPPE, UFRJ.

LIMAA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; FONTANA, J. D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochem. Eng. J.*, v. 18, p. 65-71, 2004.

MAHADIK, N. D.; Puntambekar, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process biochemistry*, v. 38, p. 715-721, 2002.

MALDONADO, R. R. *Produção, Purificação e Caracterização da lipase de Geotrichum candidum obtida a partir de meios industriais*. São Paulo:2006. Dissertação de Mestrado. UNICAMP.

MANUEL, F.; FRANCISCO, J. P.; OSCAR, M. N.; FUENSANTA, R.; ANTONIO, B. Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. *J. Chem. Technol. Biotechnol*, v. 75, p. 569-576, 2000.

MARTINS, T. S. Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682). Dissertação de mestrado. Rio de Janeiro: 2001. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Rio de Janeiro.

MIRANDA, O. A.; SALGUEIRO, A. A.; PIMENTEL, M. C. B.; FILHO, J. L.; MELO, E.H.M.; DURÁN, N. Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using na industrial residue. *Bioresour Technol.*, v. 69, n.2, p. 145-147, 1999.

PALEKAR, A. A.; VASUDIVAN, P. T.; YAN, S. Purification of Lipase: a Review. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 18, n 3, p. 177-2000, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemistry 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 enzyme. *Current Science*, v. 77, p. 149-162, 1999.

PALMA, M.; PINTO, A. L.; GOMERT, A. K.; SEITZ, K. H.; KIVATINITZ, S. C.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid water of industrial babassu oil production as substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84-86, p.1137-1145, 2000.

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

PINHEIRO, T. L. F., Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo. Erechim: 2006. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada.

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

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

SHARMA, R.; SONI, S. K.; VOHRA, R. M.; GUPTA, L. K.; GUPTA, J. K. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Process biochemistry*, v. 37, p. 1075-1084, 2002.

Capítulo 6– Referências Bibliográficas

SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U. U. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* v.19, p. 627-662, 2001.

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

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

SILVA, C. H.; PULS, J.; SOUSA, M.V.; FERREIRA FILHO, E.X. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Revista de Microbiologia*, v. 28, p. 152-156, 2000.

SNELLMAN, E. A.; SULLIVAN, E. R.; COLWELL, R. R. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. *Biochemical Engineering Journal*, v. 11, p. 269-274, 2002.

STOCKLEIN, W.; SZTAJER, H.; MENGE, U.; SCHMID, R.D. Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1168, n. 2, p.181-189, 1993.

VARGAS, G. D. L. P. Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato. Erechim: 2004. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada.

VIKINESWARY, S.; ABSULLAH, N.; RENUVATHANI, M.; SEKARAN, M.; PANDEY, A.; JONES, E. B. G. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 171-177, 2006.

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

XU, X. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalysed reactions; a Review. *European Journal of Lipid Science And Technology*, v. 34, p. 287-303, 2000.

7 ANEXOS

Anexo I

Reagente de Bradford

Para o preparo do reagente de Bradford, 100 mg de Laomassi Brilhante Blue foram dissolvidos em 50 mL de etanol e transferidos a um balão volumétrico de 1 L. Foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85%. A solução resultante foi diluída em água destilada até o volume final de 1 L.

A solução foi filtrada e transferida para um frasco âmbar e identificado e foi preparada uma curva padrão de albumina, conforme apresentada na Tabela 7.1.

Tabela 7.1. Curva Padrão Albumina utilizada para medida de proteína pelo método de Bradford.

Tubo	Reag. Bradford (mL)	Vol. Tampão pH 6,5 (μ L)	Vol. Solução Padrão Alb. (μ L)	mg Proteína
0	3	100	0	0,00
1	3	80	20	0,02
2	3	70	30	0,03
3	3	60	40	0,04
4	3	40	60	0,06
5	3	30	70	0,07

Anexo II

Preparo das Membranas de Diálise

O procedimento adotado para utilização das membranas de diálise consistiu em preparar 1 L de solução de EDTA 1 mM com 2% de bicarbonato de sódio, utilizando água miliQ estéril. A solução teve seu pH ajustado para 7,98 à 8,0. Ferveu-se por 10 minutos as membranas nesta solução. Esperou-se esfriar e lavou-se individualmente cada membrana com água miliQ estéril.

Após preparou-se 1 L de solução EDTA 1 mM com água miliQ estéril ajustando o pH para 8,0. Ferveu-se por 10 minutos as membranas nesta solução. Deixou-se esfriar e guardou-se em geladeira.

Anexo III

Ficha Técnica do Carvão Ativo

A Tabela 7.2 apresenta a caracterização do carvão ativo utilizado como suporte de imobilização do extrato enzimático obtido a partir de *Penicillium verrucosum* por FES.

Tabela 7.2. Características Carvão Ativo ANF - Carvorite®.

Aspecto	Pulverizado
Granulometria	38% a 45% retido pela malha de mesh 325
pH	5,0 a 6,5
Eficiência relativa	75%
Cinzas	5% a 7%
Densidade aparente	0,450 g/cm ³
Umidade ao embalar	<4%
Filtrabilidade	Ótima

Fonte: Empresa Carvorite – Irati/PR

Anexo IV

Curva de Calibração Atividade Enzimática do Extrato Enzimático Imobilizado

A Tabela 7.3 apresenta a curva de calibração para medida da atividade enzimática do extrato imobilizado, obtida a partir do p-nitrofenol. Preparava-se uma solução de p-nitrofenol adicionando-se 0,00811 g de p-nitrofenol a 10,93 mL de acetonitrila.

Tabela 7.3. Curva de Calibração utilizada para medida da atividade de hidrólise do extrato enzimático imobilizado.

Ensaio	Sol. p-nitrofenol (µL)	Água (µL)	Tampão Fosfato de sódio 25 mM (µL)
1	0,000	1,050	1,95
2	0,005	1,045	1,95
3	0,010	1,040	1,95
4	0,015	1,035	1,95
5	0,020	1,030	1,95
6	0,025	1,025	1,95
7	0,030	1,020	1,95

Reagente p-nitrofenol Butirato

O Reagente p-nitrofenol Butirato foi preparado conforme descrito abaixo:

Peso Molecular (PM)p-nitrofenol Butirato = 206,2 g/gmol

Capítulo 7– Anexos

$$\text{Densidade} = 1,19 \text{ g/cm}^3$$

$$M = \frac{\text{massa}}{PM}$$

$$\text{massa} = (0,05) \times 209,2$$

$$\text{massa} = 10,46\text{g}$$

$$d = \frac{\text{massa}}{\text{volume}}$$

$$1,19 = \frac{10,46}{\text{volume}}$$

$$\text{volume} = 8,79\text{mL}$$

São necessários 8,79 mL de p-nitrofenol Butirato para 1000mL de solução, logo para 5 mL foram utilizados 0,0439 mL de p-nitrofenol Butirato em 5 mL de acetonitrila.