

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

**ESTUDO COMPARATIVO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR
FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO
Penicillium sp. LIVRE E IMOBILIZADO**

ELISÂNGELA WOLSKI

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 2008

Estudo comparativo da produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Penicillium* sp. livre e imobilizado

Elisângela Wolski

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)

Rogério Luis Cansian, D. Sc.
URI-Campus de Erechim

Geciane Toniazzo, D. Sc.
URI- Campus de Erechim

Erechim, 25 de Fevereiro de 2008

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

Dedico esta conquista à minha querida família, por tanto amor e auxílio que sempre, sempre me destinam. E a você Ismael, meu amor, minha alegria, a paz que eu preciso.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado sabedoria e guiado meu caminho.

Aos meus pais, Francisco e Zeroni e minha única irmã Tarla, por terem me mantido, incentivado e me auxiliarem em tudo que precisei, por todo amor e carinho que sempre me dedicaram, por serem tão especiais e cuidarem tanto de mim.

Ao meu querido e grande amor, meu noivo Ismael, fonte de incentivo e paciência, por ter acreditado em mim, ter vivido comigo cada momento de alegria ou dificuldade, por ser tão doce, por me querer tão bem e por ter todo o amor do mundo.

Às minhas orientadoras, Prof Débora de Oliveira e Prof Helen Treichel, por terem acreditado em mim e por tantos momentos de aprendizado, paciência e amizade, por me guiarem quando eu estava perdida, e me fazerem acreditar que tudo daria certo, foi muito que em vários sentidos aprendi... .

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia por terem me acolhido e me auxiliarem em que precisei.

À colega de laboratório Elisandra, por ter fornecido a cepa do microrganismo, e ter dividido comigo seu conhecimento em momentos de dúvida.

À minha querida amiga e bolsista Elizangele, por ter chegado na hora certa, e ter me contemplado com sua amizade sincera e auxílio na pesquisa e por tantos, tantos momentos das mais variadas ocasiões, pelas risadas, pelo choro e pelas massinhas.

À estagiária Aniassana, pelo empenho, simpatia e auxílio na pesquisa.

À minha grande amiga e colega Cilda, pela amizade e por ter convivido comigo durante todo o tempo, pelo acolhimento e por tantos momentos, conselhos e conversas, minha melhor lembrança.

À Prof Janaína Burkert, por ter me acolhido na FURG durante o tempo de intercâmbio e pelo conhecimento e carinho oferecidos.

Aos demais colegas e amigos do Curso de Mestrado em Engenharia e Alimentos da URI - Campus de Erechim, pelo compartilhamento de estudos e pelos momentos de descontração.

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

*Concedei-nos Senhor, serenidade necessária
para aceitar as coisas que não podemos modificar,
coragem para modificar aquelas que podemos e
sabedoria para distinguirmos umas das outras.*

Reinhold Niebuhr

RESUMO

Estudo comparativo da produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Penicillium* sp. livre e imobilizado

Elisângela Wolski

Fevereiro/2008

Orientadores: Débora de Oliveira e Helen Treichel

O objetivo deste trabalho foi investigar a produção de lipase por fermentação submersa em meio sintético utilizando *Penicillium* sp. livre e imobilizado. Através da técnica de planejamento experimental avaliaram-se os efeitos de variáveis de processo para maximização da produção com microrganismo livre e imobilizado. Em seguida avaliou-se a melhor condição de imobilização do microrganismo para produção de lipase, utilizando a técnica de planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta, visando obter condições que maximizassem a produção da enzima. Observou-se que a fermentação utilizando o microrganismo livre apresentou atividade lipásica de 9,5 U/mL em 96 horas de fermentação. A fermentação realizada utilizando microrganismo imobilizado em cápsulas de alginato de sódio obteve atividade máxima de 20,96 U/mL em 120 horas. O extrato enzimático bruto produzido através do microrganismo livre apresentou condições ótimas de atividade a 42°C e pH 5,5 e manteve-se estável a 25°C e pH 6,5. O extrato enzimático bruto obtido através do microrganismo imobilizado apresentou condições ótimas de atividade a 37°C e pH 7,0 e manteve-se estável na faixa de temperatura de 25 e 35°C e pH 5,5. O extrato enzimático obtido através do microrganismo livre pôde ser armazenado em temperatura de congelamento até 160 dias sem perda da atividade de hidrólise, e a 5°C manteve atividade de hidrólise por 134 dias. O extrato obtido pelo microrganismo imobilizado foi armazenado a -10 °C por 60 dias sem perda significativa de atividade.

ABSTRACT

A comparative study of lipase production by submerged fermentation using free and immobilized *Penicillium* sp.

Elisângela Wolski

Fevereiro/2008

Advisors: Débora de Oliveira e Helen Treichel

The main objective of this work was to investigate the lipase production by submerged fermentation of free and immobilized cells of *Penicillium* sp. The effects of some process variables on lipase production were evaluated in laboratory scale, using the experimental design technique and response surface analysis, in order to obtain the conditions that maximize the production of the enzyme using free cells of the microorganism. In a second step it was evaluated the best condition for microorganism immobilization with the main objective of maximizing the lipase production. The experimental design technique was also used in this step. From the results obtained it was observed that the fermentation using the free microorganism presented lipase activities of 9.5U/mL in 96 hours of fermentation. The optimum experimental condition for immobilized microorganism in calcium alginate capsules led to activities of 20.96U/mL in 120 hours of fermentation. The crude enzymatic extract obtained from free microorganism presented optima activities at 42°C and pH 5.5 and kept stable at 25°C and pH 6.5. The crude enzymatic extract obtained from immobilized cells of *Penicillium* sp. presented optimum pH and temperature of 7.0 and 37°C, respectively, and stayed stable in the range of temperature from 25 to 35°C in pH values of 5.5. The crude enzymatic extract obtained from free cells maintained its activity at freezing temperature up to 160 days and at 5°C up to 134 days without loss of activity. On the other side, the extract obtained from immobilized microorganism was stored at -10°C for 60 days without significant loss of activity.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1.DEFINIÇÃO DE LIPASES.....	3
2.2. APLICAÇÕES DE LIPASES.....	5
2.3.PRODUÇÃO DE LIPASES.....	7
2.4. PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA	8
2.4.1. Considerações Gerais.....	8
2.5.IMOBILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS.....	13
2.6.PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO MICRORGANISMO IMOBILIZADO.....	16
2.7.CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LIPASES... ..	18
2.8.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. MATERIAIS.....	22
3.2.EQUIPAMENTOS.....	22
3.3. MÉTODOS.....	23
3.3.1. Produção de Lipase por Fermentação Submersa utilizando <i>Penicillium</i> sp. Livre.....	23
3.3.1.1. Microrganismo.....	23
3.3.1.2. Preparo do Inóculo.....	23
3.3.1.3. Preparo dos Meios de Cultivo.....	24
3.3.1.4. Preparo das Amostras.....	24
3.3.1.5. Determinação da Atividade de Hidrólise.....	24
3.3.1.6. Estudo da Produção de Lipase.....	25
3.3.2. Produção de Lipase por Fermentação Submersa utilizando <i>Penicillium</i> sp. Imobilizado.....	27

3.3.2.1 Imobilização do microrganismo.....	27
3.3.2.2. Estudo da produção de lipase com o microrganismo imobilizado	28
3.3.3. Caracterização parcial da lipase obtida por fermentação submersa.....	29
3.3.3.1. Temperatura e pH Ótimos.....	30
3.3.3.2. Temperatura de Estabilidade.....	30
3.3.3.3. pH de Estabilidade.....	31
3.3.3.4. Estabilidade do Extrato Enzimático a Baixas Temperaturas.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1. ESTUDO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO <i>Penicillium</i> sp. LIVRE.....	32
4.1.1. <i>Screening</i> de variáveis para produção de lipase utilizando microrganismo livre.....	32
4.1.2. Avaliação da concentração de inóculo na produção de lipases	36
4.1.3. Maximização da produção de lipase utilizando microrganismo livre.....	37
4.2. ESTUDO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO <i>Penicillium</i> sp. IMOBILIZADO.....	43
4.2.1. Estratégia sequencial de planejamento experimental para otimização da produção de lipase utilizando microrganismo imobilizado.....	43
4.2.1.1. Primeiro planejamento experimental.....	43
4.2.1.2. Segundo planejamento experimental.....	47
4.2.1.3. Terceiro planejamento experimental.....	50
4.2.1.4. Quarto planejamento experimental.....	53
4.3. CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS OBTIDOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO <i>Penicillium</i> sp.	58
4.3.1. Microrganismo livre.....	58
4.3.1.1. Temperatura e pH ótimos.....	58

4.3.1.2. Temperatura de estabilidade	60
4.3.1.3. pH de estabilidade	61
4.3.1.4. Estabilidade do extrato enzimático bruto armazenado à baixas temperaturas	62
4.3.2 Microrganismo imobilizado.....	64
4.3.2.1. Temperatura e pH ótimos.....	64
4.3.2.2. Temperatura de estabilidade	66
4.3.2.3. pH de estabilidade	67
4.3.2.4. Estabilidade do extrato enzimático bruto armazenado à baixas temperaturas.....	72
4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES	75
5.1. CONCLUSÕES.....	75
5.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	76
 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Aplicações industriais de lipases.....	5
Tabela 2.2. Microrganismos produtores de lipases.....	9
Tabela 3.1. Variáveis e níveis no planejamento experimental PB de 12 ensaios mais 3 pontos centrais para produção de lipase por FS em meio sintético.....	26
Tabela 3.2. Avaliação da concentração do inóculo na produção de lipases.....	26
Tabela 3.3. Faixa de estudo das variáveis do planejamento experimental completo 2 ⁴ (19 experimentos).....	27
Tabela 3.4. Faixa de estudo das variáveis das matrizes de planejamento para produção de lipase com o microrganismo imobilizado.....	30
Tabela 3.5. Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2 ² para temperatura e pH ótimos da enzima obtida por FS com <i>Penicillium</i> sp. livre e imobilizado.....	31
Tabela 4.1. Matriz do planejamento experimental PB de 12 ensaios mais 3 pontos centrais (valores codificados e reais) com as respostas da atividade lipásica no decorrer da FS.....	33
Tabela 4.2. Estudo da concentração do inóculo.....	37
Tabela 4.3. Matriz do planejamento fatorial completo 2 ⁴ (valores codificados e reais) com as respostas da atividade de lipase no decorrer da FS utilizando microrganismo livre.....	38
Tabela 4.4. Análise de variância para a atividade lipásica com microrganismo livre.....	41
Tabela 4.5. Matriz do primeiro planejamento experimental completo de 16 ensaios com as respostas da atividade lipásica no decorrer da FS utilizando microrganismo imobilizado.....	44
Tabela 4.6. Matriz do segundo planejamento experimental completo de 16 ensaios com as respostas da atividade lipásica no decorrer da FS utilizando microrganismo imobilizado.....	48

Tabela 4.7. Matriz do terceiro planejamento experimental completo de 11 ensaios com as respostas da atividade lipásica no decorrer da FS utilizando microrganismo imobilizado.....	51
Tabela 4.8. Matriz do quarto planejamento experimental completo de 11 ensaios com as respostas da atividade lipásica no decorrer da FS utilizando microrganismo imobilizado.....	54
Tabela 4.9. Análise de variância para a atividade lipásica com microrganismo imobilizado.....	55
Tabela 4.10. Matriz do planejamento experimental completo para avaliação de temperatura e pH ótimos (valores codificados e reais) com as respostas da atividade de lipase para o microrganismo livre.....	58
Tabela 4.11. Matriz do planejamento experimental completo para avaliação de temperatura e pH ótimos (valores codificados e reais) com as respostas da atividade de lipase para o microrganismo imobilizado.....	65
Tabela 4.12. Parâmetros cinéticos: Constante de desativação térmica e tempo de meia vida em função da temperatura para o extrato enzimático obtido por <i>Penicillium</i> sp. livre.....	70
Tabela 4.13. Parâmetros cinéticos: Constante de desativação térmica e tempo de meia vida em função da temperatura para o extrato enzimático obtido por <i>Penicillium</i> sp. imobilizado.....	71
Tabela 4.14. Dados da caracterização parcial dos extratos enzimáticos brutos, produzidos através do microrganismo livre e imobilizado.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Aparato experimental utilizado para imobilização do microrganismo.....	28
Figura 4.1. Gráfico de Pareto da produção de lipases utilizando microrganismo livre em 48 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental PB.....	34
Figura 4.2. Gráfico de Pareto da produção de lipases utilizando microrganismo livre em 72 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental PB.....	35
Figura 4.3. Gráfico de Pareto da produção de lipases utilizando microrganismo livre em 96 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental PB.....	36
Figura 4.4. Gráfico de Pareto da produção de lipases utilizando microrganismo livre em 48 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental completo.....	39
Figura 4.5. Gráfico de Pareto da produção de lipases utilizando microrganismo livre em 72 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental completo.....	40
Figura 4.6. Superfícies de resposta do comportamento da atividade enzimática em função (a) concentração do óleo de oliva e NaCl, (b) NaCl e peptona e (c) óleo de oliva e peptona.....	42
Figura 4.7. Gráfico de Pareto da produção de lipases utilizando microrganismo imobilizado em 48 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental completo.....	46
Figura 4.8. Gráfico de Pareto da produção de lipases utilizando microrganismo imobilizado em 72 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental completo.....	46
Figura 4.9. Gráfico de Pareto da produção de lipases utilizando microrganismo imobilizado em 96 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental completo.....	47

Figura 4.10. Gráfico de Pareto da produção de lipases utilizando microrganismo imobilizado em 72 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental completo.....	50
Figura 4.11. Gráfico de Pareto para produção de lipase por fermentação submersa utilizando microrganismo imobilizado em 96 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental completo.	52
Figura 4.12. Gráfico de Pareto para produção de lipase por fermentação submersa utilizando microrganismo imobilizado em 120 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental completo.....	52
Figura 4.13. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) pra produção de lipases utilizando <i>Penicillium</i> sp. imobilizado.	56
Figura 4.14. Grânulos de <i>Penicillium</i> sp. imobilizado em alginato de cálcio.	57
Figura 4.15. Microrganismo imobilizado imerso em solução de glutaraldeído.	57
Figura 4.16. Gráfico de Pareto para determinação da temperatura e pH ótimos da atividade lipásica obtida com o microrganismo livre.	59
Figura 4.17. Atividade lipásica em função do tempo e da temperatura de incubação do extrato enzimático produzido por FS e <i>Penicillium</i> sp. livre.	60
Figura 4.18. Atividade lipásica em função do tempo e do pH de incubação do extrato enzimático produzido por FS e <i>Penicillium</i> sp. livre.....	61
Figura 4.19. Estabilidade do extrato enzimático (obtido da fermentação utilizando microrganismo livre) armazenado em congelador (-10°C).	63
Figura 4.20. Estabilidade do extrato enzimático (obtido da fermentação utilizando microrganismo livre) armazenado em geladeira (4°C).	64
Figura 4.21. Gráfico de Pareto para determinação da temperatura e pH ótimos da atividade lipásica obtida com o microrganismo imobilizado.	66
Figura 4.22. Atividade lipásica em função do tempo e da temperatura de incubação do extrato enzimático produzido por <i>Penicillium</i> sp. imobilizado	67
Figura 4.23. Atividade lipásica em função do tempo e do pH de incubação do extrato enzimático produzido por <i>Penicillium</i> sp. imobilizado	68

Figura 4.24. Gráfico linearizado para equação de Arrhenius (microrganismo livre).	71
Figura 4.25. Gráfico linearizado para equação de Arrhenius (microrganismo imobilizado).	71
Figura 4.26. Estabilidade do extrato enzimático (obtido da fermentação utilizando microrganismo imobilizado) armazenado em congelador (-10°C).....	73
Figura 4.27. Estabilidade do extrato enzimático (obtido da fermentação utilizando microrganismo imobilizado) armazenado em geladeira (5°C).....	73

1. INTRODUÇÃO

Lipases (Triacilglicerol éster hidrolases EC 3.1.1.3), conhecidas como hidrolases, têm a função natural de catalisar a hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa. Lipases atuam na interfase orgânica aquosa catalisando a hidrólise de ligações éster carboxilases presentes em acilgliceróis para liberar ácidos orgânicos e glicerol podendo a reação inversa (síntese) ocorrer em ambientes não aquosos. Nestas condições podem catalisar reações de esterificação, transesterificação ou interesterificação. Sua estabilidade a altas temperaturas, ampla faixa de atuação em relação ao pH e sua enâncio seletividade na resolução de misturas racêmicas tornam estas enzimas atraentes e versáteis (Freire e Castilho, 1999; Sharma et al., 2001).

Hoje, aproximadamente 4.000 enzimas são conhecidas, e destas, cerca de 200 são usadas comercialmente, sendo que a maioria das enzimas é de origem microbiana (Sharma et al., 2001).

As lipases têm encontrado aplicações em diversos tipos de indústrias, tais como de alimentos (aditivos, modificadores de aromas), química fina (síntese de ésteres), detergente (remoção de gorduras), tratamento de efluentes (remoção de produtos oleosos) e farmacêutica (remédios, digestivos, enzimas para diagnósticos, etc). O potencial de uso industrial das lipases em detergentes, biotransformações e reações de interesterificação e transesterificação também têm despertado interesse por essas enzimas. Lipases com especificidade comprovada têm especial importância nas reações de transformação e interesterificação, uma vez que os produtos formados podem ser mais facilmente obtidos por via enzimática do que em processos químicos convencionais (Maldonado, 2006). Muitas aplicações industriais destas enzimas são ainda limitadas pelo alto custo de produção e baixa produtividade. Em muitos casos, a fermentação para produção de lipases é lenta e o custo relativamente alto (Yang et al., 2005).

Considerando o aspecto econômico para produção de lipases por processos fermentativos, alguns métodos têm sido comumente empregados para

aumentar a produtividade do processo: um consiste na seleção do microrganismo e otimização das condições de fermentação para aumentar a atividade lipásica; o outro consiste na redução do tempo de fermentação. Muitos trabalhos científicos têm focado na otimização do processo fermentativo para aumentar a atividade lipásica (Pinheiro, 2006).

A produção de lipases pode ser realizada por fermentação submersa (FS) ou por fermentação em estado sólido (FES). A FES baseia-se em crescimento e metabolismo dos microrganismos em sólidos úmidos sem a presença de água livre e a FS utiliza meio de cultura líquido, com nutrientes solúveis (Castilho et al., 2000). Neste caso, as células podem ser utilizadas na forma livre ou imobilizada.

Basicamente, a imobilização de células vivas é muito semelhante ao procedimento adotado para enzimas. Várias células têm sido imobilizadas: bactérias, leveduras, fungos, etc. Uma das maiores atividades na área da biotecnologia tem sido a imobilização de células inteiras, por geralmente promover maiores rendimentos da atividade da enzima e maior estabilidade operacional. Vários suportes têm sido utilizados, tais como polissacarídeos naturais, alginatos, ágar, poliacrilamida, etc (Hemachander, 2001).

Com isso, estudos sobre a utilização de microrganismos e diferentes formas de disponibilizá-los em meio de fermentação líquido, o mais utilizado na realidade industrial, podem ser uma alternativa para encontrar condições operacionais ideais para produção de lipases com maiores rendimentos.

A partir destes aspectos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de lipases por fermentação submersa, em meio sintético, utilizando como microrganismo *Penicillium* sp. na forma livre e imobilizado em alginato de sódio. Investigou-se o efeito de algumas variáveis do processo e diferentes condições do suporte de encapsulamento, para produção de lipase em escala de bancada, utilizando a técnica de planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta, visando estabelecer condições que maximizassem a produção da enzima quando da utilização do microrganismo livre e imobilizado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão sobre lipases incluindo definição, aplicações, fontes e propriedades, considerações gerais sobre fermentação submersa, bem como imobilização de microrganismos e sua utilização para produção de enzimas.

2.1. DEFINIÇÃO DE LIPASES

Lipases são enzimas pertencentes ao grupo das serina hidrolases (triacilglicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3). Seus substratos naturais são triglicerídeos e o seu modo de ação se assemelha ao das esterases, porém, sua atividade é aumentada quando situada na interface polar/apolar e apresenta maior afinidade por ácidos graxos de cadeia longa. As lipases são capazes de catalisar reações de hidrólise, esterificação, transesterificação e lactonização (esterificação intramolecular). Esta flexibilidade, aliada a diferentes possibilidades de especificidade pelo substrato existentes nas diferentes lipases, confere a estas enzimas um potencial enorme de aplicações (Gandhi, 1997).

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 e poderem mais facilmente ser expressas, via clonagem, em outros organismos, o que facilita sua obtenção e purificação (Palekar et al., 2000).

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 pelo substrato e facilidade de produção em larga escala, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial (Hasan et al., 2006).

Além das funções metabólicas, as lipases possuem um papel importante em biotecnologia, principalmente na indústria de óleos e alimentos, e em síntese orgânica, na preparação de compostos enantiomericamente enriquecidos (Sharma et al., 2001; Costa e Amorim, 1999).

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

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 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).

Vários microrganismos têm sido utilizados na produção de lipases; bactérias, tais como: *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Achromobacter sp*; fungos, tais como: *Aspergillus sp*, *Mucor*, *Rhizopus sp*, *Penicillium sp*, *Geotrichum sp*; leveduras como: *Tulopsis sp* e *Candida sp* (Liu et al., 2006).

Do ponto de vista industrial, os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação.

2.2. APLICAÇÕES DE LIPASES

O crescente interesse no uso de lipases encontra-se principalmente em aplicações industriais de larga escala, incluindo formulações de detergentes, degradação de óleos e gorduras, sínteses farmacêuticas e produção de cosméticos (Liu et al., 2006).

Embora atualmente as aplicações das lipases estejam concentradas nas indústrias de detergentes e de alimentos e ainda sejam, em sua maioria, baseadas nas reações de hidrólise, novas aplicações decorrentes também das reações de síntese e transterificação e das características enâncio e régio seletivas das lipases vêm se estabelecendo nos mais diversos campos: indústria farmacêutica, de química fina, de cosméticos, oleoquímica, de couros, de polpa e papel e no tratamento de resíduos industriais (Castilho et al., 2000). A Tabela 2.1 apresenta algumas aplicações industriais das lipases (Maldonado 2006).

Tabela 2.1 Aplicações industriais de lipases.

Indústria	Aplicação
Laticínios	Hidrólise de gordura do leite
Panificação	Aumento do aroma e da vida de prateleira
Cervejaria	Aceleração da fermentação em função dos lipídios
Carne	Desenvolvimento do aroma e remoção do excesso de gordura
Farmacêutica	Digestão de óleos e gorduras em alimentos
Médica	Determinação de triglicerídeos no sangue
Papel	Tratamento de polpas de celulose
Tratamento de resíduo	Decomposição e remoção de substâncias oleosas

Fonte: Maldonado, 2006.

Para aplicação industrial, a especificidade da lipase é um fator crucial. A enzima pode ser específica com relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato. As lipases são divididas em 3 grupos baseados em sua especificidade. Lipases não específicas (ex: produzidas por *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum* e *Pseudomonas* sp.) que catalisam a quebra

das moléculas de acilglicerol de forma aleatória, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Neste caso, os produtos são similares aqueles produzidos por catálise química, porém com menor grau de termodegradação, devido à temperatura na biocatálise ser bem inferior.

Lipases 1,3 específicas (ex: de *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus niveus* e *Penicillium roquefortii*) liberam ácidos graxos das posições 1 e 3 e formam, por esta razão, produtos com composições diferentes daquelas obtidas pelas lipases não-regiosseletivas, ou mesmo pelo catalisador químico inferior.

Lipases ácido graxo específicas são lipases com ação específica na hidrólise de ésteres, cujos ácidos graxos são de cadeia longa insaturada com duplas ligações, em *cis* no carbono 9. Ésteres com ácidos graxos insaturados, ou sem insaturação no carbono 9, são lentamente hidrolisados. Este tipo de especificidade não é comum entre as lipases e o exemplo mais estudado até hoje é a lipase de *Geotrichum candidum*. Esta habilidade de produzir novos tipos de misturas de triacilglicerídeos utilizando lipases regioespecíficas é uma das características mais interessantes para a aplicação no setor de óleos e gorduras (Castro et al., 2004).

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) são utilizadas em processos que consomem uma grande quantidade de energia como hidrólise, glicérolise e alcoólise (Hasan et al., 2006).

Além disto, as enzimas microbianas são freqüentemente mais utilizadas que as derivadas de plantas ou animais devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, à 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 mais conveniente e mais segura (Hasan et al., 2006).

Uma aplicação que tem merecido destaque é a utilização de lipases na obtenção de fármacos ou insumos farmacêuticos em suas formas enantioméricas ativas com elevada pureza ótica, pois estas enzimas são capazes de reconhecer moléculas quirais e atuam, preferencialmente, em um dos isômeros de uma mistura racêmica. É conhecido que alguns fármacos são produzidos e comercializados na sua forma racêmica, e que a atividade biológica depende, em muitos casos, de sua configuração absoluta. Normalmente um dos isômeros (*R* ou *S*) apresenta atividade biológica, enquanto o outro é menos ativo ou até mesmo tóxico (Hasan et al., 2005).

2.3. PRODUÇÃO DE LIPASES

Para atender o aumento da demanda e exploração comercial de lipases, métodos fáceis e capazes de ter custo eficaz de produção de lipases microbianas devem ser desenvolvidos e melhorados.

A composição do meio e condições de fermentação geralmente têm um papel central na produção de lipases, bem como a identificação de uma formulação de meio que seja efetivo e a condição da cultura utilizada é de grande importância para a otimização da produção (Liu et al., 2006).

Lipases microbianas são produzidas na maior parte por fermentação submersa (FS), mas o método de fermentação no estado sólido (FES) também pode ser usado. A FES é um processo de cultivo de microrganismos, principalmente fungos filamentosos, em substratos sólidos umedecidos, mas com ausência de água livre entre as partículas do material sólido. A FS é um processo que utiliza um meio de cultura líquido, sendo este o mais utilizado e descrito em maior número de trabalhos com maiores detalhes (Martins, 2001).

Por outro lado, as enzimas de interesse biotecnológico têm sido tradicionalmente produzidas por fermentação submersa (FS), devido à maior facilidade de controle e de operação do processo tendo como característica principal a utilização de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis,

sendo este o processo mais utilizado atualmente para produção de enzimas (Martins, 2001; Alonso, 2001).

A otimização das condições de fermentação para lipases microbianas é de grande interesse, desde que as condições de cultura não influenciem nas propriedades da enzima, bem como na proporção de lipase extracelular e intracelular. A quantidade de lipase produzida é dependente de vários fatores como a composição do meio de cultura, concentração de nitrogênio, fontes de carbono e lipídio, concentração de sais inorgânicos, temperatura de cultivo, pH do meio de cultura e ainda a oxigenação e agitação. A produção de lipases pode ser estimulada por certos lipídios tais como manteiga, óleo de oliva e ácidos graxos (Wooley e Peterson, 1994).

Burkert et al. (2004) e Maldonado (2006) investigaram a produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552 em frascos agitados utilizando meio de cultivo contendo peptona como fonte de nitrogênio e óleo de soja como indutor da produção, e também com controle das condições de pH inicial do meio de fermentação e de temperatura de produção da enzima. As condições otimizadas de produção da enzima foram 3,58%(p/v) de peptona e 0,64%(p/v) de óleo de soja, pH inicial do meio de fermentação igual a 7,0, temperatura de produção de 30°C, agitação de 250rpm, sendo que nestas condições 20U/mL de atividade enzimática foi obtida. Alguns trabalhos citados na literatura referentes aos microrganismos produtores de lipases por FS estão apresentados na Tabela 2.2.

2.4. PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

2.4.1. Considerações Gerais

Desde a época do pós-guerra mundial, a indústria de fermentação passou por um período de grande expansão, devido ao rápido desenvolvimento de métodos para a produção de antibióticos em cultivo submerso. As enzimas de interesse industrial, em especial as lipases, têm sido produzidas por culturas líquidas submersas. As fermentações submersas apresentam grande

homogeneidade e, conseqüentemente, eficiente transferência de nutrientes, principalmente quando o substrato utilizado é um triglicerídeo (Castilho et al., 2000).

Os bioprocessos industriais com fungos filamentosos abrangem a produção da maioria dos produtos comercialmente importantes da biotecnologia, no sentido da quantidade bem como da diversidade dos metabólitos. Estes são principalmente os processos de culturas submersas, onde um relacionamento dinâmico existe entre circunstâncias ambientais e o padrão de crescimento destes microrganismos (Znidarsic e Pavco, 2001).

Tabela 2.2 Microrganismos produtores de lipases.

Microrganismo	Autor/ Referência	Atividade lipásica
<i>Aspergillus niger</i>	Ellaiah et al. (2004)	4,29 U/mL
<i>Ralstonia pickettii</i>	Hemachander et al. (2001)	8,5 U/mL
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Sztajer et al. (1992)	2,4 U/mL
<i>Candida rugosa</i>	Benjamin e Pandey (1997)	14,9 U/mL
<i>Aspergillus niger</i>	Mahadik et al. (2004)	4,1 U/mL
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Yang et al. (2005)	3,15 U/mL
<i>Penicillium verrucosum</i>	Kempka et al. (2008)	3,15 U/mL

As lipases fúngicas são produzidas tipicamente por processos submersos de fermentação, com o uso dos meios de cultura complexos que podem incluir como ingredientes, aminoácidos e fontes complexas de compostos orgânicos tais como extrato de levedura, peptona e óleos. Para fungos do gênero *Penicillium*, os melhores resultados podem ser obtidos com fontes orgânicas de nitrogênio ou a combinação de fontes orgânicas e inorgânicas, como extrato de peptona ou de levedura com sulfato do amônio, do que com compostos inorgânicos como a única fonte do nitrogênio (Lima et al., 2003).

A fermentação submersa consiste de um meio fermentativo líquido, com nutrientes solúveis e é uma das metodologias mais usadas para a produção de lipases (Alonso, 2001).

A otimização das condições de fermentação para a produção de lipases microbianas é de suma importância, uma vez que os parâmetros de cultivo influenciam as propriedades do microrganismo produtor, assim como a razão de lipases extracelulares e intracelulares produzidas. A quantidade de lipases produzidas depende de diversos fatores, tais como fontes de carbono e nitrogênio, presença de lipídios, de indutores ou inibidores, concentrações de sais inorgânicos, disponibilidade de oxigênio, temperatura, pH e inóculo (Castilho et al., 2000).

Com relação à melhor formulação de meio de cultivo para produção de lipases fúngicas, regras gerais não têm sido reportadas, mas podem ser detectadas diversas tendências, comuns a muitos trabalhos. Como fonte de lipase, além dos triglicerídeos ou derivados, podem ser utilizados diversos carboidratos como a glicose, maltose, sacarose, sorbitol, xilose e o amido (Castilho et al., 2000).

A produção de lipases fúngicas requer altas concentrações de fontes de nitrogênio, quando comparada à produção de outras enzimas. Dentre as principais fontes citadas na literatura, a peptona vem sendo a mais utilizada. Essa fonte é usualmente adicionada na faixa de 1 a 7%(p/v) ao meio de fermentação. O extrato de levedura também vem sendo empregado como fonte única de nitrogênio, ou complementando um meio contendo peptona, em níveis de adição que variam de 0,1 a 1%(p/v) (Castilho et al., 2000).

A maioria dos microrganismos produtores de lipases necessita de um indutor para promover a síntese enzimática, podendo este ser um triglicerídeo, um éster ou um ácido graxo, que pode ser adicionado ao meio com única fonte de carbono ou em adição a carboidratos, em concentrações reduzidas. O meio de cultivo utilizado para produção de lipases fúngicas é em geral complexo (sintético ou natural), adicionado de indutores, muito freqüentemente o óleo de oliva (Castilho et al., 2000).

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

Em relação à temperatura, a fermentação para produção de lipases fúngicas é normalmente realizada na faixa de 22 a 30 °C (Castilho et al., 2000).

A produção de lipases de *Aspergillus niger* J-1 foi testada por Falony et al. (2006) usando a fermentação submersa (FS) e fermentação estado sólido (FES), em um meio de cultura mineral constituído de farelo de trigo. A otimização do meio de cultura foi realizada para FS e FES. A atividade máxima do lipase, 1,46U/mL, foi obtida durante a fermentação submersa em um meio contendo glicose a 2%(p/v) e óleo de oliva a 2%(p/v), em condições de 1vvm e 450 m⁻¹ com atividade lipolítica. 4,8U/mL foram alcançados usando o processo de fermentação em estado sólido com um meio que continha 0,75%(p/v) de sulfato de amônia e 0,34%(p/v) de uréia. O pH e temperatura ótimos para a atividade enzimática foram pH 6 e 40 °C, sendo que a enzima apresentou 80% de sua atividade em meio neutro em temperaturas entre 20 e 30 °C por um período de 24h.

Pesquisando a produção de lipase por *Penicillium roqueforti* S-86, Petrovic et al. (1990) utilizaram um meio de cultura contendo 0,2% de K₂HPO₄; 0,05%(p/v) de KCl; 6,5%(p/v) de MgSO₄.7H₂O e 0,3%(p/v) de (NH₄)₂SO₄. Testaram diferentes fontes de carbono como glicose, frutose e sacarose (2%(p/v)), gordura de manteiga (1 e 2%(p/v)) e óleo de oliva (2%(p/v)), verificando que uma atividade lipásica máxima de 10U/mL foi obtida após 6 dias de produção, utilizando 2%(p/v) de glicose com pH inicial 4,0 a 27 °C e 220rpm. Também foi testada a mudança da fonte de nitrogênio de sulfato de amônio para 1,5%(p/v) de bactopectona, tendo sido observado, neste caso, uma diminuição de 6 para 4 dias para obtenção da produção máxima da enzima.

A produção e algumas propriedades de lipase extracelular de *Penicillium citrium* foram investigadas por Maliszewska e Mastalerz (1992) apud Burkert (2002). A lipase extracelular foi produzida em meio de cultivo basal contendo 2%(p/v) de amido, 0,5%(p/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,0255%(p/v) de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5%(p/v) de CaCO_3 , 0,05%(p/v) de K_2HPO_4 , 0,1%(p/v) de extrato de levedura e 5%(p/v) de peptona a 2%(p/v) e 122rpm, e sua produção foi aumentada seis vezes, alcançando 4,776U/mL em 168 horas de fermentação, com a adição de 0,1%(p/v) de óleo de oliva. Várias gorduras foram testadas como suplementos, sendo que a tributirina foi o melhor substrato para a produção desta lipase. A atividade ótima ocorreu em pH 7,2 a 30°C. A atividade da enzima foi estável na faixa de pH 5-7 e numa faixa de temperatura de 10 a 40°C.

A produção de lipase por um mutante de *Aspergillus niger* NCIM 1207 em fermentação submersa foi testada por Mahadik et al. (2004). O mutante UV-10 em frascos agitados dobrou a produtividade da enzima quando acrescidos de 1%(p/v) de óleo de oliva. A máxima atividade de lipase (4,1U/mL) foi obtida em meio suplementado com 0,5%(p/v) de Triton X-100. Uma elevada concentração de óleo não aumentou a produção de lipase e nem um aumento dos níveis de produção de lipase foi observado quando o UV-10 cresceu em meio suplementado com glicose. Já a cepa selvagem de *Aspergillus niger* NCIM 1207 crescida em meio suplementado com glicose resultou em níveis aumentados da produção de lipase.

Sztajer et al. (1992) produziram lipase de *Penicillium simplicissimum* em frascos agitados a 30°C com 120rpm e alcançaram uma atividade de 2,4U/mL, após cerca de 48 horas de fermentação. Trabalhando em um fermentador de bancada a 30°C, com 100rpm e 120L/h de aeração, os mesmos autores obtiveram 6,9U/mL no mesmo tempo de fermentação.

A purificação e as propriedades da lipase produzida por *Penicillium simplicissimum* foram investigadas por Sztajer et al. (1992). Os autores testaram 3 meios de cultura para produção da lipase. O meio I foi constituído de peptona 3%(p/v), extrato de levedura 1%(p/v), NaCl 0,9%(p/v) e 1%(p/v) de indutor em tampão fosfato 50 mM pH 7,0; o meio II com 2%(p/v) de amido, 0,3%(p/v) de NaNO_3 , 0,05%(p/v) de KCl, 0,05%(p/v) de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001%(p/v)

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1%(p/v) de indutor em tampão fosfato 50mM pH 7,0 e o meio III, contendo peptona 1%(p/v), farinha de soja 2%(p/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1%(p/v) CaCl_2 0,005%(p/v), K_2HPO_4 0,2%(p/v) em 1L de água destilada. As condições de produção em frascos agitados foram 30°C e 120rpm, utilizando como indutor a trioleína e alcançando com o meio I 2,4U/mL após cerca de 48 horas de fermentação. Não houve produção de lipase para os meios II e III.

Uma linhagem brasileira de *Penicillium citrinum* foi investigada como produtora de lipase por Pimentel et al. (1994) apud Burkert (2002). O microrganismo cultivado em meio contendo 1%(p/v) de óleo de oliva e 0,5%(p/v) de extrato de levedura resultou em uma máxima atividade de 4,09U/mL. Na caracterização da enzima, a temperatura ótima encontrada para atividade enzimática foi na faixa de 34-37°C. Após tratamento a 60°C por 30 minutos a enzima foi completamente inativada. O pH ótimo para a atividade enzimática foi 8,0.

2.5. IMOBILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Uma das maiores atividades na área da biotecnologia recentemente tem sido a imobilização de enzimas e microrganismos. A razão por escolher imobilização de células inteiras não é somente porque elimina as etapas de purificação e extração da enzima, mas também porque fornece maiores rendimentos da atividade da enzima depois da imobilização, maior estabilidade operacional, grande resistência às perturbações ambientais, baixo e eficaz custo de produção (Hemachander, 2001).

A imobilização é um termo que descreve as muitas formas das células serem encapsuladas ou aprisionadas em um determinado suporte. O conceito de microencapsulação de células é simples. Consiste em envolver o material com atividade biológica em uma matriz polimérica envolvida por uma membrana semipermeável. Esta membrana permite a difusão de nutrientes, oxigênio e protege de perdas internas da célula de ambos, stress mecânico e compostos tóxicos, usados em células envolvidas (Qi et al., 2006).

Sistemas de imobilização são aplicados em enzimas, organelas celulares, microbianas, animais e células de plantas. Esses sistemas são investigados no sentido de envolver a biocatálise dentro de um espaço tais como aqueles onde eles retêm suas atividades e podem ser reutilizados por várias vezes por um longo período de tempo (Peinado et al., 2006).

Camargo et al. (2006) estudaram a imobilização de células de *Aspergillus niger* para biotransformação de (-) β - pineno. Na etapa de imobilização utilizaram o método de gelatinização, com alginato de sódio a 4%(p/v) gotejado em solução de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5M, sendo que o microrganismo imobilizado mostrou melhores resultados para a conversão.

A encapsulação celular representa um método promissor para várias proteínas e antibióticos. A biocompatibilidade das microcápsulas é claramente importante, bem como os requerimentos para ótima biocompatibilidade, incluindo uma ótima microgeometria da estrutura da membrana, um procedimento de encapsulação com uma ótima capacidade para envolver as células com grânulos perfeitos e o uso de materiais apropriados (Orive et al., 2002).

Basicamente, a imobilização de células vivas é muito semelhante ao processo aplicado para enzimas. Várias células têm sido imobilizadas: bactérias, leveduras, fungos, etc. No entanto, é preciso ter conhecimento de alguns problemas que possam acontecer. Um dos problemas está na resistência à transferência de massa, imposto pelo fato de que o substrato tem para difusão para o local da reação e inibição ou produtos tóxicos que podem ir para o ambiente. A transferência da taxa de oxigênio é freqüentemente limitante em culturas de células suspensas, e isto pode ser ainda maior em células imobilizadas, por isso a oxigenação em culturas de células imobilizadas é um dos maiores problemas técnicos que permanecem para ser resolvidos. Dentro dos menores problemas de oxigenação, técnicas de imobilização têm sido principalmente trabalhadas em processos anaeróbios e ou anaeróbios facultativos (Wang, www.eng.umd.edu/~nSw/ench485/lab11.htm, retirado em 29/11/2007).

A imobilização de microrganismos e enzimas possui crescente interesse para aplicação em processos biotecnológicos para conversão e bioremediação. A

importância econômica tem mostrado resultados consideráveis em pesquisas e uma larga taxa de aplicações industriais particularmente na indústria farmacêutica. Comparada com culturas livres, a imobilização de microrganismos apresenta grandes vantagens, incluindo alta taxa de crescimento e alta biomassa em reator, alta taxa de diluição com ou sem processos contínuos, fácil purificação de bioprodutos e boa estabilidade catalítica de biocatálise, bem como melhor tolerância em altas concentrações de compostos tóxicos e carga tóxica (Qi et al., 2006).

A imobilização de células tem sido bastante utilizada para produção de químicos e degradação de efluentes poluentes. A imobilização celular é um dos mais atrativos métodos para resolver os problemas inerentes ao uso de bactérias livres, incluindo a facilidade de separação de células. As maiores vantagens no uso de microrganismos imobilizados é a sua alta estabilidade operacional, sua facilidade de uso em reatores contínuos, alta densidade de célula e habilidade de “scale up” (Mariano e Dalton, 1999).

O aprisionamento de células em matrizes poliméricas é amplamente utilizado para a imobilização celular. São utilizados polímeros naturais como alginato, carragena, agar, quitosana, entre outros e polímeros sintéticos como poli(acrilamida), poli(acrilato) e poliuretano (Qi et al., 2006).

Vários métodos têm sido relatados para envolvimento de células inteiras sob condições que tendem a minimizar perdas de atividade devido às condições de reação e reagentes usados. Um dos mais promissores tem sido o uso de moléculas poliméricas, sintéticas ou naturais, as quais podem ser induzidas para formar géis na presença das células.

Polímeros naturais e sintéticos são utilizados como suporte na imobilização de inúmeros tipos de recheio incluindo proteínas, enzimas, microrganismos, aditivos alimentícios, pesticidas e compostos com atividade farmacológica. Alguns polímeros gelificam por gelificação iônica, gelificação térmica ou por uma combinação desses dois mecanismos. A preparação de microcápsulas através da gelificação iônica envolve a gelificação de uma solução polimérica aquosa com um íon de baixa massa molar, onde polieletrólitos de cargas opostas interagem

formando um complexo. Mediante essa técnica, o material de recheio é extrusado como gota dentro de uma solução, formando uma gota gelificada (Rocha e Grosso, 2006).

Entre os hidrocolóides utilizados na forma de microcápsulas, encontram-se pectinas de baixo teor de esterificação, carragena e alginato de cálcio, todos requerendo um íon para a reticulação da matriz. A principal vantagem do gel de alginato é sua habilidade de ser termoestável, podendo ser armazenado à temperatura ambiente (Rocha e Grosso, 2006).

O alginato pode ser considerado como da família dos co-polímeros desde a fração e seqüência de dois monômeros, α -L- ácido galurônico (G) e β -D-ácido manurônico (M), variar sobre uma larga taxa (Draget et al., 1997). O alginato tem sido o polímero mais utilizado para encapsulação celular (Orive et al., 2002).

2.6. PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO MICRORGANISMO IMOBILIZADO

Existem poucas publicações na literatura sobre imobilização de células microbianas para produção de lipases (Elibol e Ozer, 2000).

Ellaiah et al. (2004) investigaram a produção de lipases por células imobilizadas de *Aspergillus niger*, testando diferentes materiais para o encapsulamento, tais como alginato, k-carragena e poliacrilamida. O efeito de diferentes períodos de incubação, a concentração ótima de alginato de sódio e o reuso das células imobilizadas também foram avaliadas. A máxima produção da enzima, (4,290U/L) foi observada utilizando o microrganismo livre, 4,225U/mL de células imobilizadas com 3%(m/v) de alginato, 3850U/L de K-carragena e 4,075U/mL de células imobilizadas em poliacrilamida. Óleo de oliva foi utilizado como indutor em todos os casos.

A imobilização de células de *Rhizopus arrhizus* em um suporte sólido (espuma de poliuretano) para produção de lipases foi estudada por Elibol e Ozer (2000). Uma maior atividade lipolítica foi obtida quando foi usado óleo de milho como indutor, comparando à suplementação com glicose. Os experimentos

revelaram que a imobilização de células de *Rhizopus arrhizus* demonstrou boa reprodutibilidade, produzindo uma quantidade igual de enzima depois de 120 horas. Já quando estocada a 4°C, a enzima diminuiu 26% de sua atividade em 160 horas.

Hemachander et al. (2001) pesquisaram a imobilização de células de *Ralstonia pickettii* para produção de lipases em diferentes matrizes, ágar, alginato e poliacrilamida. A atividade enzimática em células imobilizadas em ágar foi baixa, máxima de 8,5U/mL em 120 horas. Os grânulos em alginato apresentaram algumas desvantagens por dissolver no meio e a adição de glutaraldeído não apresentou efeito significativo. A concentração de 4%(p/v) de alginato conduziu à atividade enzimática ótima de 14U/mL. Quando diferentes concentrações de poliacrilamida foram usadas, a lipase mostrou atividade de 25U/mL com 15%(p/v) de poliacrilamida. Das três matrizes avaliadas, a poliacrilamida a 20%(p/v) foi a que proporcionou a melhor atividade (24,75U/mL) pelo reuso de três vezes com diminuição de 10% da atividade.

Benjamin e Pandey (1997) usaram *Candida rugosa* imobilizada para produção de lipases em reator de leito empacotado. Testaram os agentes geleificantes ágar, alginato de cálcio e poliacrilamida. Alginato de cálcio foi estabelecido por ser o mais apropriado agente geleificante. A adição de ácidos graxos em 0,75g/L melhorou o rendimento de produção da enzima, e ácido caprílico foi considerado o melhor deles, produzindo 14,9U/mL de lipases em 36h. Também foi suplementado o meio com goma arábica em combinações com ácido caprílico, o que promoveu aumento na atividade lipásica. A máxima atividade enzimática foi 17,94U/mL, obtida quando a fermentação foi conduzida em bioreator de leito empacotado, em grupos repetidos usando um método de meio alimentado contendo goma arábica e ácido caprílico, com taxa de fluxo de alimentação de 0,4mL/min, tendo permitido cada ciclo continuar por até 12 horas. Os rendimentos com células imobilizadas em poliacrilamida foram 3,9 vezes menores que aqueles obtidos em células encapsuladas com alginato de cálcio.

Yang et al. (2005) estudaram a produção de lipases por micélio imobilizado de *Rhizopus arrhizus* em poliuretano por fermentação submersa. Encontraram alta

atividade de lipase, 3,15U/mL em condições de 26°C, 130rpm e em frascos agitados. Através das condições em frascos, grupos repetidos de fermentação pelo micélio imobilizado foram conduzidos bem como a composição do meio foi otimizada. As células imobilizadas mostraram alta estabilidade para uso repetido. Nove repetições foram conduzidas em frascos por 140 horas e 6 grupos repetidos em fermentador de 5L. A produtividade de lipase aumentou de 3,1U/mL/hr em grupos de fermentação para 17,6U/mL/hr em grupos repetidos de fermentação.

2.7. CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LIPASES

A estabilidade das enzimas é um dos fatores de maior importância na indústria, devido ao fato de algumas serem instáveis em determinadas condições de processamento, tornando-as rapidamente inativas (Segel, 1993 *apud* Oliveira, 2003).

Muitas lipases têm sido caracterizadas em termos de suas atividades e estabilidades relativas ao pH e temperatura. É importante saber de sua estabilidade para poder aplicar em condições ideais dos processos de interesse de uso da enzima.

A estabilidade frente a diferentes valores de temperatura e de pH são importantes parâmetros para uso de enzimas em biocatálise orgânica. Para a estabilidade, muitos resultados são encontrados na literatura, provavelmente devido à diferenças quanto ao tempo e temperatura de incubação. Além de estabilidade na faixa básica, também se verifica estabilidade em valores de pH fortemente ácidos (pH 2,0) a fortemente alcalinos (pH 12,0). O que se observa é que a estabilidade destas enzimas varia entre os gêneros, as espécies e até entre isoformas produzidas por uma mesma cepa (Lima, 2004).

Lipase de *Penicillium restrictum* incubada com diferentes tampões, em diferentes faixas de pH apresentou maior atividade enzimática em tampão fosfato pH 5,5 (Freire et al. 1997). Kempka et al. (2008), estudando a caracterização de lipase de *Penicillium verrucosum*, determinaram como temperatura ótima 44°C e pH ótimo de 7,0.

Liu et al. (2006) obtiveram em seu trabalho de otimização da produção de lipase por *Burkholderia* sp. em fermentação submersa, pH e temperatura ótimas de 9,0 e 55°C, respectivamente, sendo portanto uma lipase alcalina.

Nas condições estudadas, a lipase de *Rhizopus* sp. em extrato bruto apresentou maior atividade na faixa de pH entre 6,0 e 6,5 e o extrato bruto permaneceu estável na faixa de temperatura entre 40 e 50°C, mantendo uma atividade relativa superior a 70% (Pastore, 2003).

No estudo de Elibol e Ozer (2000), a lipase produzida por *Rhizopus arrhizus* imobilizado foi armazenada em refrigerador a 4°C e a atividade lipolítica da enzima diminuiu 26% da sua atividade original depois de 160 horas.

A lipase produzida por *Antrodia cinnamomea* apresentou atividade ótima com pH 8,0 e 40°C, e tanto a atividade quanto a estabilidade diminuíram significativamente com valores de pH acima de 10. A estabilidade da atividade enzimática foi testada na faixa de temperatura de 25°C a 60°C e apresentou-se estável na faixa de 25°C a 45°C (Shu et al., 2006). Burkert (2002) e Burkert et al. (2004) verificaram que a lipase produzida por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552 apresentou condições ótimas de atividade a 37°C e em pH 7,0 e observaram que a estabilidade da lipase é maior em baixas temperaturas, como a de 30°C, por exemplo.

A lipase produzida por *Aspergillus niger* caracterizada por Kamini et al. (1998) apresentou atividade ótima em pH 7,0 e 37°C e mostrou-se estável em valores de pH entre 4,0 e 10,0 e na faixa de temperatura de 40°C a 50°C, sendo que esta também manteve sua estabilidade na presença de detergentes.

Kamini et al. (1998), ainda neste estudo, compararam a estabilidade térmica da lipase produzida por fermentação submersa e por fermentação em estado sólido, verificando que a primeira manteve 57% de atividade a 60°C, enquanto a segunda manteve 69% de atividade sob a mesma temperatura, mostrando que *Aspergillus niger* possui habilidade em produzir a enzima com maior estabilidade térmica por fermentação em estado sólido.

2.8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da revisão bibliográfica apresentada neste capítulo pôde-se relatar a importância pela busca de novas cepas produtoras de lipase, bem como a imobilização destas cepas, devido ao grande interesse e campo de aplicação industrial desta enzima.

Verifica-se que, dependendo do microrganismo usado na fermentação e do tipo de fermentação, a lipase obtida possui uma especificidade em particular. As inúmeras variáveis que envolvem o processo de obtenção da enzima vão desde a composição do meio até as condições operacionais como pH, temperatura, agitação e forma de condução do processo fermentativo.

É muito importante um processo de fermentação adequado, por isso a otimização da produção da enzima é necessário. As lipases fúngicas são produzidas tipicamente por processos submersos de fermentação, com o uso dos meios de cultura complexos.

Na tentativa de melhorar as condições de processo, a imobilização do microrganismo traz vantagens em termos de condições operacionais, pelo fato de que podem eliminar as etapas de purificação e extração da enzima e também porque podem fornecer maiores rendimentos da atividade da enzima depois da imobilização, maior estabilidade operacional e grande resistência às perturbações ambientais.

A literatura apresenta vários microrganismos que já foram anteriormente imobilizados em diferentes suportes para diferentes funções, como por exemplo, *Aspergillus niger* para biotransformação, *Rhizopus arrhizus* para produção de lipase, entre outros.

Com isso é de grande importância a consecução de estudos sistemáticos na busca por processos e condições mais apropriadas que proporcionem maior conhecimento sobre conduções de processos, visando obter as condições ótimas de produção de lipase a partir de microrganismos isolados e pré-selecionados. A caracterização da enzima também se torna interessante, pois possibilita um maior

conhecimento das propriedades da lipase obtida, visando propor aplicações futuras.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais, procedimentos experimentais e a metodologia analítica utilizada para o desenvolvimento do estudo da produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Penicillium* sp. livre e imobilizado.

3.1. MATERIAIS

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

- Acetona (Quimex);
- Alginato de Sódio (Vetec);
- Cloreto de Cálcio (Vetec);
- Etanol 95% (Quimex);
- Fenolftaleína (Nuclear);
- Fosfato de Sódio Monobásico (Vetec);
- Fosfato de Sódio Bibásico (Vetec);
- Glutaraldeído (Vetec);
- Goma Arábica (Synth);
- Hidróxido de Sódio (Nuclear);
- Meio PDA (Composição: após o preparo de 39g em 1L o meio contém: 4g/L de infusão de batata, 20g/L de glicose e 15g/L de agar) (Acumedia);
- Óleo de Oliva (Arisco);
- Biftalato de Potássio (Nuclear);
- Tween 80 (Vetec);
- Tris- HCl (Vetec).

3.2. EQUIPAMENTOS

Os principais equipamentos utilizados neste estudo foram os seguintes:

- Câmara de fluxo laminar (Pachane);
- Estufa para secagem (Marconi);
- Balança analítica (Bel Engineering);
- Agitador orbital (Marconi MA- 410);
- Mixer manual (Black & Decker);
- Titulador automático (Mettler Toledo DL 50 Graphix);
- Agitador Magnético (Fisatom);
- Refrigerador (Brastemp);
- Bomba peristáltica (Masterflex ® L\ S ®).

3.3. MÉTODOS

Nesta seção será apresentada a metodologia empregada para a produção, imobilização do microrganismo e caracterização da lipase produzida por fermentação submersa utilizando *Penicillium* sp.

3.3.1. Produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Penicillium* sp. livre

3.3.1.1. Microrganismo

O fungo *Penicillium* sp. usado para o estudo foi isolado previamente em farelo de soja, no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da URI-Campus de Erechim. Este microrganismo foi pré-selecionado como bom produtor de lipase através das metodologias de seleção em meio sólido e líquido. Este fungo tem sido permanentemente estocado em glicerol, sob refrigeração. A propagação de esporos para posterior fermentação foi feita por um período de 7 dias a 28°C.

3.3.1.2. Preparo do inóculo

O Meio (Potato Dextrose Agar – PDA) foi constituído por PDA 3,9%(m/v) e água destilada. Após a solubilização completa do componente, 100mL de meio

eram transferidos para um erlenmeyer de 500mL e então autoclavados a 121°C por 15 minutos.

Um *eppendorf* com a cepa do microrganismo era retirado da refrigeração, agitado e transferido para o erlenmeyer, mantendo-se em câmara de germinação a 28°C por 7 dias. O recolhimento de esporos era feito adicionando-se 20mL de solução Tween 80 (0,1%v/v) e cacos de porcelana estéreis ao erlenmeyer. Obtinha-se, então, uma suspensão de esporos da qual retirava-se 4mL. Este volume era transferido para um tubo com 6mL de solução de Tween 80, para diluição 10^{-6} , e era, então, inoculado no meio de cultivo. A suspensão de esporos restante pode ser estocada a 4°C por até, no máximo, 15 dias.

3.3.1.3. Preparo dos Meios de Cultivo

O meio sintético para fermentação submersa era composto de peptona bacteriológica, extrato de levedura, cloreto de sódio e óleo de oliva. A fermentação foi realizada em erlenmeyer de 500mL tampado com algodão envolvido por gaze. Os meios de cultivo eram autoclavados a 121°C por 15 minutos e, após resfriamento, inoculava-se a suspensão de esporos previamente diluída até concentração de esporos desejada (2×10^6 esporos/mL).

3.3.1.4. Preparo das Amostras

Após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação em agitador rotatório a 28°C e 180rpm, em condições pré-estabelecidas no planejamento de experimentos, eram retiradas amostras e filtradas em lã de vidro. O extrato filtrado era utilizado para dosagem de atividade lipásica.

3.3.1.5. Determinação da 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 100mM pH 7,0. A 18mL desta emulsão contidos em erlenmeyers de 125mL foram adicionados 2mL da amostra. Após incubação por 15 minutos a 37°C e 150rpm, a reação foi interrompida e os ácidos graxos extraídos pela adição de

20mL de uma solução de acetona/etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos eram, então, titulados com uma solução de NaOH (0,05M) até pH 11. Os brancos reacionais eram preparados colocando-se acetona/etanol após a incubação em agitador orbital e então acrescentava-se os 2mL de amostra, realizando-se, após, a titulação. As dosagens da atividade foram feitas em triplicata quando o planejamento estudado era do tipo Plackett-Burman, e a média aritmética dos valores encontrados foi utilizada para o cálculo da atividade de hidrólise.

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

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

onde:

A= Atividade de hidrólise (U/mL);

V_a= Volume da amostra titulada (mL);

V_b= Volume do branco titulado (mL);

V_c= Volume da amostra usada na reação (mL);

t= Tempo de reação (minutos);

M= Molaridade da solução de NaOH.

3.3.1.6. Estudo da Produção de Lipase

O tempo e a temperatura de fermentação foram definidos como 96 horas e 28°C, respectivamente, segundo resultados obtidos anteriormente em estudo prévio com *Penicillium verrucosum* (Kempka et al., 2008).

Para que as condições de produção de lipase por fermentação submersa fossem otimizadas, utilizou-se a técnica de planejamento fatorial de experimentos e análise de superfície de resposta.

Na etapa do estudo de otimização da produção de lipase aplicou-se a técnica de planejamento de experimentos utilizando-se uma matriz do tipo

Plackett-Burman (PB) de 12 ensaios mais 3 pontos centrais, para que os principais efeitos das variáveis em estudo pudessem ser avaliados. A Tabela 3.1 apresenta as variáveis e faixa de valores estudados neste planejamento. Após análise dos resultados foi realizado um estudo de concentração do inóculo, mostrado na Tabela 3.2, e em uma terceira etapa aplicou-se um planejamento fatorial completo 2^4 , fixando a temperatura em 28°C e a concentração do inóculo em 4%(m/v), valores apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.1. Variáveis e níveis no planejamento experimental PB de 12 ensaios mais 3 pontos centrais para produção de lipase por FS em meio sintético.

Nível	Temperatura (°C)	Inóculo (%m/v)	Peptona (%m/v)	Extrato de levedura (%m/v)	Cloreto de sódio (%m/v)	Óleo de Oliva (%m/v)
-1	28	2,5	2	0,5	0,5	1
0	32	7,5	5	1,75	1,75	1,5
+1	36	12,5	8	3	3	2

Para a realização do estudo da concentração do inóculo foram fixadas as concentrações de peptona a 2%(m/v), extrato de levedura e cloreto de sódio a 0,5%(m/v), óleo de oliva 1%(m/v) e a temperatura em 28°C.

Tabela 3.2 Avaliação da concentração do inóculo na produção de lipases.

Ensaio	Inóculo (%v/v)
1	2
2	4
3	6

3.3.2. Produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Penicillium* sp. imobilizado

O microrganismo, o preparo do inóculo, preparo de meios de cultivo, preparo de amostras e a determinação da atividade de hidrólise, foram realizados como descrito anteriormente nas seções 3.3.1.1, 3.3.1.2, 3.3.1.3, 3.3.1.4, 3.3.1.5, respectivamente.

Nesta etapa será descrito o procedimento experimental utilizado para imobilização do microrganismo, bem como a condução da fermentação para produção de lipase com o microrganismo imobilizado.

Tabela 3.3 Faixa de estudo das variáveis do planejamento experimental completo ²⁴ (19 experimentos).

Nível	Peptona (%m/v)	Extrato de levedura (%m/v)	Cloreto de sódio (%m/v)	Óleo de Oliva (%m/v)
-1	2	0,5	0,5	1
0*	5	1,75	1,75	1,5
+1	8	3	3	2

Temperatura = 28°C, Inóculo = 4%(v/v)

3.3.2.1 Imobilização do microrganismo

Foram preparadas soluções de alginato de sódio e cloreto de cálcio em determinadas concentrações e também água destilada. As soluções e a água eram colocadas em erlenmeyers, tampados com algodão envolvido por gaze, fechados com alumínio e levados para esterilizar, em autoclave a 121°C por 15 minutos e após resfriamento iniciava-se o processo de imobilização.

A cada 25mL de solução de alginato de sódio eram misturados 10mL de suspensão de inóculo. Esta mistura permanecia em agitação constante em agitador magnético. A seguir, através de uma bomba peristáltica, a mistura de alginato de sódio com a suspensão de esporos era bombeada por gotejamento a

uma velocidade de aproximadamente 20mL/min e à distância de 15cm da solução encapsulante, até o erlenmeyer contendo a solução de 250mL de cloreto de cálcio que era mantido sob agitação constante com agitador magnético, até o final do processo de imobilização. As cápsulas geleificadas eram mantidas em repouso nessa solução conforme o tempo estabelecido no planejamento de experimentos a 5°C para maturação. A Figura 3.1 apresenta o aparato experimental montado para a etapa de imobilização do microrganismo.



Figura 3.1 Aparato experimental utilizado para imobilização do microrganismo.

Após a maturação, as cápsulas eram filtradas e lavadas com água destilada estéril por duas ou três vezes e deixadas na solução de glutaraldeído por 15 minutos e depois lavadas novamente com água destilada estéril e então adicionadas ao meio de fermentação.

3.3.2.2. Estudo da produção de lipase com o microrganismo imobilizado

Nesta etapa, para que as condições de produção de lipase com o microrganismo imobilizado fossem otimizadas, foi realizado um planejamento de experimentos para as variáveis relacionadas com a imobilização do microrganismo.

A Tabela 3.4 apresenta as variáveis e intervalos de estudo utilizados nos quatro planejamentos realizados. No primeiro planejamento experimental, as variáveis avaliadas foram concentração de alginato de sódio, de cloreto de cálcio, de glutaraldeído e tempo de cura dos grânulos. As outras variáveis referentes às condições (temperatura e agitação) e meio de fermentação, foram fixadas como sendo a condição otimizada anteriormente com o microrganismo livre.

Finalizado o segundo planejamento experimental, foram fixadas as variáveis concentração de alginato de sódio e de cloreto de cálcio, variando a concentração de glutaraldeído e o tempo, em uma matriz 2^2 de 11 experimentos.

Após análise dos resultados do terceiro planejamento, não foi possível validar um modelo experimental, com isso, partiu-se para uma quarta matriz de planejamento variando as concentrações das mesmas variáveis, sendo que a faixa de estudo de cada variável está apresentada na Tabela 3.4.

3.3.3. Caracterização parcial da lipase obtida por fermentação submersa

Nesta etapa, a lipase obtida com o *Penicillium* sp. livre e imobilizado, foi parcialmente caracterizada em termos de temperatura e pH ótimo, e de estabilidade ao armazenamento a baixas temperaturas, conforme metodologia descrita a seguir.

3.3.3.1. Temperatura e pH Ótimos

Na determinação dos valores ótimos de temperatura e pH para a atividade lipásica, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 para o extrato enzimático bruto obtido.

Adicionou-se tampão fosfato de sódio com diferentes valores de pH à emulsão utilizada como substrato para medida de atividade lipásica e as amostras foram incubadas a diferentes temperaturas por 15 minutos e 150rpm. As faixas de pH e temperatura estudadas são apresentadas na Tabela 3.5. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.3.3.2. Temperatura de estabilidade

A fim de determinar a temperatura de estabilidade do extrato enzimático obtido por fermentação submersa com o *Penicillium* sp. livre e imobilizado, este foi submetido à diferentes temperaturas no banho termostático, sendo estas: 25°C, 35°C, 45°C, 55°C, 65°C. As dosagens de atividade lipásica nos tempos 0, 30, 60, 120, 240 e 360 minutos após incubação foram realizadas conforme descrito anteriormente. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Tabela 3.4 Faixa de estudo das variáveis das matrizes de planejamento para produção de lipase com o microrganismo imobilizado.

Variáveis	Níveis				
	Primeiro planejamento experimental				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Alginate de sódio (%m/v)	-	2	3	4	-
CaCl ₂ (%m/v)	-	0,2	1,1	2	-
Glutaraldeído(%v/v)	-	0	1	2	-
Tempo (h)	-	6	15	24	-
Segundo planejamento experimental					
Alginate de sódio (%m/v)	-	2	2,5	3	-
CaCl ₂ (%m/v)	-	0,2	0,6	0,8	-
Glutaraldeído (%v/v)	-	0,5	1	1,5	-
Tempo (h)	-	1	6	11	-
Terceiro planejamento experimental					
Alginate de sódio (%m/v)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
CaCl ₂ (%m/v)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Glutaraldeído (%v/v)	0,8	1	1,5	2	2,2
Tempo (h)	1,7	3	6	9	10,7
Quarto planejamento experimental					
Alginate de sódio (%m/v)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
CaCl ₂ (%m/v)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Glutaraldeído (%v/v)	0	0,4	1,5	2,6	3
Tempo (h)	11,75	1,9	6	10,1	1,25

Tabela 3.5. Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^2 para temperatura e pH ótimos da enzima obtida por FS com *Penicillium* sp. livre e imobilizado.

Nível	Temperatura (°C)	pH
-1,41	30	4,88
-1	32	5,5
0	37	7,0
+1	42	8,5
+1,41	44	9,11

3.3.3.3. pH de estabilidade

Para determinação do pH de estabilidade, os extratos enzimáticos obtidos, produzidos com o *Penicillium* sp. livre e imobilizado, foram incubados em tampão fosfato de sódio de pH (6,5; 7,5) e Tris-HCl 100mM de pH (4,88; 5,5, 8,5). O extrato enzimático foi incubado a 37°C e a determinação da atividade lipásica foi realizada conforme descrito anteriormente, nos tempos 0, 30, 60 240 e 360 minutos após incubação. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.3.3.4. Estabilidade dos extratos enzimáticos a baixas temperaturas

Após 72 horas de fermentação, os extratos enzimáticos foram filtrados e armazenados em frascos à temperaturas de 4°C e de -10°C, sendo medida a atividade de hidrólise, como descrito anteriormente, no tempo 0 e a cada 7 dias, a fim de acompanhar a estabilidade da atividade da enzima.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no decorrer deste trabalho, constando da produção de lipase por FS utilizando *Penicillium* sp. livre e imobilizado e posterior caracterização parcial dos extratos enzimáticos obtidos.

4.1 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO *Penicillium* sp. LIVRE

4.1.1. *Screening* de variáveis para produção de lipase utilizando microrganismo livre

Visando otimizar o processo de produção de lipases por FS utilizando *Penicillium* sp. livre, inicialmente foi realizado um *screening* de variáveis, através do uso de um planejamento do tipo Plackett-Burman. As variáveis independentes estudadas foram temperatura, concentração de inóculo, concentração de peptona, extrato de levedura, cloreto de sódio e óleo de oliva. A resposta avaliada foi a atividade lipásica no decorrer da fermentação. A Tabela 4.1 apresenta a matriz do planejamento com os valores reais, codificados e as respostas para a atividade lipásica.

Através da Tabela 4.1 observa-se que as maiores atividades lipásicas ocorreram nos ensaios 3 (5,49U/mL) e 12 (5,92U/mL), em 96 horas de fermentação. Estes ensaios correspondem à temperatura de 28 °C.

Estudos apresentados por Kempka et al. (2008) para a produção de lipases por *Penicillium verrucosum* constataram que 27,5°C foi a temperatura ideal para a produção da enzima por este microrganismo.

Ellaiah et al. (2004) avaliando a produção de lipases por *Aspergillus niger* constataram que 28°C foi a temperatura ideal para a produção de enzimas por este microrganismo.

Tabela 4.1 Matriz do planejamento experimental PB de 12 ensaios mais 3 pontos centrais (valores codificados e reais) com as respostas da atividade lipásica no decorrer da FS.

Ensaio	X1	X2	X3	X4	X5	X6	AL (U/mL) 48h	AL (U/mL) 72h	AL (U/mL) 96h
1	1(36)	-1(2,5)	1(8)	-1(0,5)	-1(0,5)	-1(1)	0	0	0
2	1(36)	1(12,5)	-1(2)	1(3)	-1(0,5)	-1(1)	2,05	1,08	0
3	-1(28)	1(12,5)	1(8)	1(0,5)	1(3)	-1(1)	0,90	2,05	5,49
4	1(36)	-1(2,5)	1(8)	1(3)	-1(0,5)	1(2)	1,62	2,16	0,48
5	1(36)	1(12,5)	-1(2)	1(3)	1(3)	-1(1)	0	0	4,0
6	1(36)	1(12,5)	1(8)	-1(0,5)	1(3)	1(2)	0	2,34	2,04
7	-1(28)	1(12,5)	1(8)	1(3)	-1(0,5)	1(2)	3,14	3,94	4,26
8	-1(28)	-1(2,5)	1(8)	1(3)	1(3)	-1(1)	1,76	3,84	4,16
9	-1(28)	-1(2,5)	-1(2)	1(3)	1(3)	1(2)	2,85	3,42	4,96
10	1(36)	-1(2,5)	-1(2)	-1(0,5)	1(3)	1(2)	0	0	0
11	-1(28)	1(12,5)	-1(2)	-1(0,5)	-1(0,5)	1(2)	1,70	0	2,90
12	-1(28)	-1(2,5)	-1(2)	-1(0,5)	-1(0,5)	-1(1)	3,46	5,17	5,92
13*	0(32)	0(7,5)	0(5)	0(1,75)	0(1,75)	0(1,5)	1,98	1,86	0,4
14*	0(32)	0(7,5)	0(5)	0(1,75)	0(1,75)	0(1,5)	2,50	2,40	0
15*	0(32)	0(7,5)	0(5)	0(1,75)	0(1,75)	0(1,5)	2,83	2,13	0

* Ponto Central;

Onde: X1= Temperatura (°C); X2= Inóculo (%m/v); X3= Peptona (%m/v); X4= Extrato de levedura (%m/v); X5= Cloreto de sódio (%m/v); X6= Óleo de oliva (%m/v); AL= Atividade lipásica (U/mL).

Em outro estudo realizado por Yang et al. (2005) para produção de lipase por *Rhizopus arrhizus*, os autores constataram que 26,5°C foi a melhor temperatura para a produção de lipase.

Os dados obtidos e apresentados na Tabela 4.1 em 48, 72 e 96 horas de fermentação foram tratados estatisticamente e os efeitos principais estão

apresentados na forma de Gráfico de Pareto nas Figuras 4.1, 4.2 e 4.3, respectivamente.

Observou-se que, em 48 horas de fermentação (Figura 4.1) a temperatura e a concentração de NaCl apresentaram um efeito significativo negativo ($p < 0,05$), o que representa que os menores níveis desses componentes são melhores para a produção de lipase. As outras variáveis não apresentaram efeito significativo.

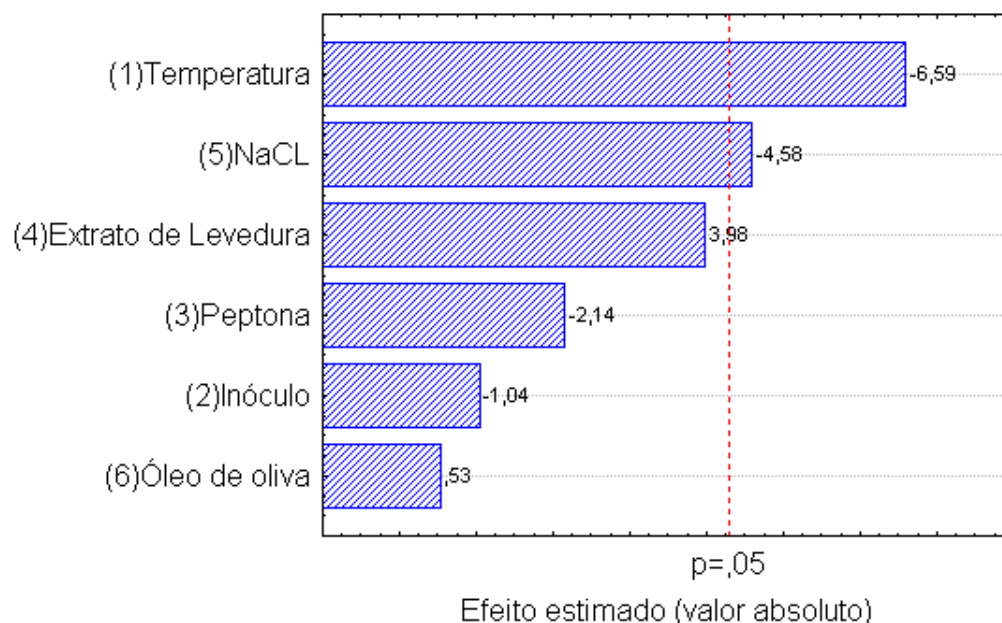


Figura 4.1. Gráfico de Pareto da produção de lipases utilizando microrganismo livre em 48 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental PB.

Burkert (2002) realizou um teste de cinética de produção de lipases em frascos agitados por *Geotrichum candidum* NRRL Y-552, encontrando o pico de atividade enzimática de 11,51U/mL em 48 horas de fermentação. Em 96 horas de fermentação não havia mais atividade lipásica, sendo o meio constituído por 5%(p/v) de peptona, 0,1%(p/v) de NaNO_3 , 0,1%(p/v) de MgSO_4 e 1%(p/v) de óleo de soja.

Analisando o Gráfico de Pareto de 72 horas de fermentação (Figura 4.2), pode-se observar que as variáveis temperatura e concentração de inóculo

apresentaram um efeito significativo negativo ($p < 0,05$), também indicando que os menores níveis desses componentes são melhores para a produtividade da lipase. As outras variáveis não apresentaram efeito significativo.

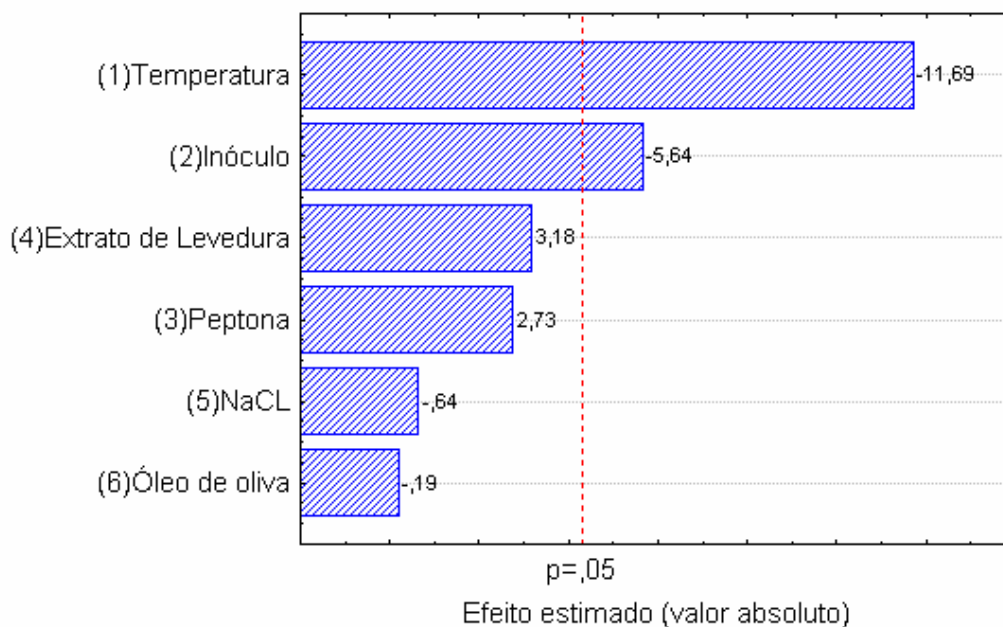


Figura 4.2. Gráfico de Pareto da produção de lipases utilizando microrganismo livre em 72 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental PB.

No Gráfico de Pareto obtido para o tempo de 96 horas de fermentação (Figura 4.3) pode-se observar que a temperatura continuou apresentando efeito significativo negativo, já a concentração de NaCl apresentou um efeito significativo positivo, mostrando que níveis maiores desse componente melhorariam a produção da lipase.

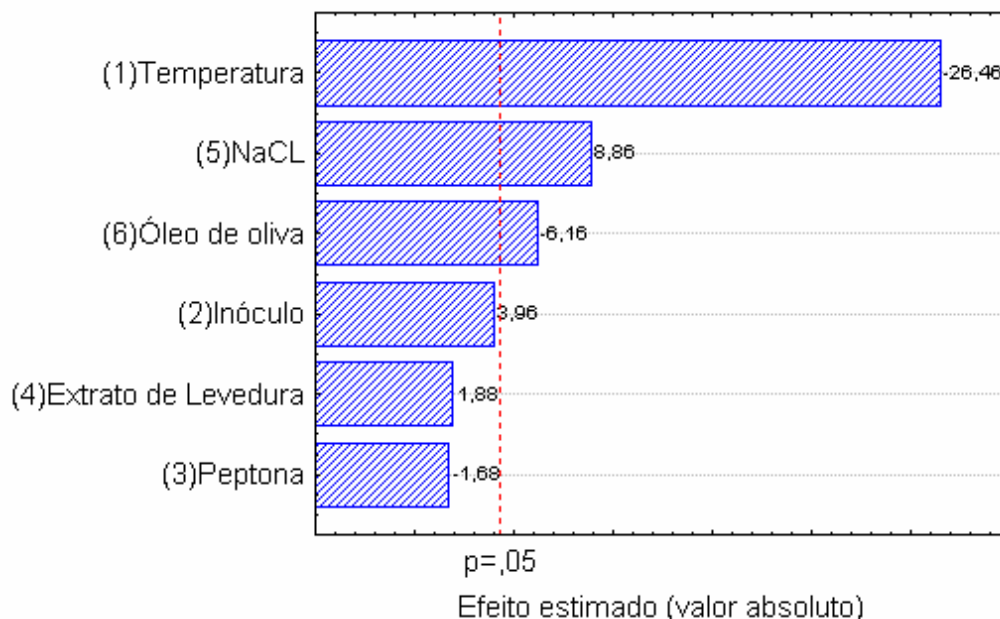


Figura 4.3. Gráfico de Pareto da produção de lipases utilizando microrganismo livre em 96 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental PB.

A partir dos resultados obtidos no primeiro planejamento de experimentos, realizou-se um estudo relacionado à avaliação da concentração de inóculo na produção de lipases.

4.1.2. Avaliação da concentração de inóculo na produção de lipases

Para avaliação da concentração de inóculo na produção de lipases, foram utilizadas diferentes concentrações, diluindo-se a suspensão de esporos em solução de Tween 80 (0,1%), sendo o volume final de inóculo sempre 10% no meio de fermentação. Os resultados obtidos nesta avaliação são apresentados na Tabela 4.2.

Como pode ser observado nesta tabela, a maior atividade de lipase (8,8U/mL) foi obtida em 96 horas de fermentação e utilizando 4%(v/v) de inóculo. Realizou-se também um teste de diferença entre médias para verificar a existência

de diferença significativa entre as amostras (95% confiança). Para tal aplicou-se o Teste de Tukey para todas as concentrações de inóculo e tempos de fermentação.

Tabela 4.2. Estudo da concentração do inóculo.

Ensaio	Inóculo (%v/v)	Atividade Lipásica (U/mL) 48h*	Atividade Lipásica (U/mL) 72h*	Atividade Lipásica (U/mL) 96h*
1	2	2,7±0,6 ^b	7,8±0,6 ^a	6,6±0,6 ^b
2	4	6,9±0,5 ^a	8,6±0,6 ^a	8,8±1,0 ^a
3	6	6,3±0,3 ^a	4,5±0,8 ^b	5,3±1,0 ^b

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

A partir dos resultados obtidos no planejamento do tipo Plackett-Burman e no estudo da concentração do inóculo, fixou-se a temperatura em 28 °C e a concentração do inóculo em 4%(v/v) e selecionou-se a peptona, extrato de levedura, NaCl e óleo de oliva como variáveis a serem estudadas em um planejamento fatorial completo 2⁴ com o objetivo de maximizar a produção de lipase.

4.1.3. Maximização da produção de lipase utilizando microrganismo livre

A matriz do planejamento experimental realizado, com os níveis codificados e reais e as respostas de atividade enzimática são apresentadas na Tabela 4.3.

A produção de lipase pôde ser observada através do acompanhamento da atividade enzimática ao longo do tempo de fermentação. As maiores atividades foram de 9,5U/mL em 96 horas no ensaio 1 e 9,2U/mL em 72 horas de fermentação no ensaio 12.

Tabela 4.3. Matriz do planejamento fatorial completo 2^4 (valores codificados e reais) com as respostas da atividade de lipase no decorrer da FS utilizando microrganismo livre.

Ensaio	X1	X2	X3	X4	AL	AL	AL
					(U/mL) 48h	(U/mL) 72h	(U/mL) 96h
1	-1(2)	-1(0,5)	-1(0,5)	-1 (1)	2,5	3,7	9,5
2	1(8)	-1(0,5)	-1(0,5)	-1 (1)	3,5	3,7	4,3
3	-1(2)	1(3)	-1(0,5)	-1 (1)	6	4,6	8,5
4	1(8)	1(3)	-1(0,5)	-1 (1)	2,5	2,2	2,95
5	-1(2)	-1(0,5)	1(3)	-1 (1)	3,5	2,5	7,8
6	1(8)	-1(0,5)	1(3)	-1 (1)	3	2,5	4,2
7	-1(2)	1(3)	1(3)	-1 (1)	4,5	6	7,8
8	1(8)	1(3)	1(3)	-1 (1)	3,2	5,7	1,4
9	-1(2)	-1(0,5)	-1(0,5)	+1 (2)	0	0	0
10	1(8)	-1(0,5)	-1(0,5)	+1 (2)	0	0	0
11	-1(2)	1(3)	-1(0,5)	+1 (2)	0	0	0
12	1(8)	1(3)	-1(0,5)	+1 (2)	8,6	9,2	6,9
13	-1(2)	-1(0,5)	+ 1(3)	+1 (2)	0	1,3	0
14	1(8)	-1(0,5)	+ 1(3)	+1 (2)	3,9	3,85	0
15	-1(2)	1(3)	+ 1(3)	+1 (2)	0	0	0
16	1(8)	1(3)	+ 1(3)	+1 (2)	3,2	2,3	0
17*	0(5)	0 (1,75)	0 (1,75)	0 (1,5)	0	2,55	0
18*	0(5)	0 (1,75)	0 (1,75)	0 (1,5)	1,7	0,9	0,8
19*	0(5)	0 (1,75)	0 (1,75)	0 (1,5)	1,6	0,8	0,8

* Ponto central;

Onde: X1= Peptona (%m/v); X2= Extrato de levedura (%m/v); X3= Cloreto de sódio (%m/v); X4= Óleo de oliva (%m/v); AL= Atividade lipásica (U/mL).

Sztajer et al. (1992) produziram lipase a partir de *Penicillium simplicissimum* em frascos agitados a 30°C e 120 rpm, alcançando uma atividade de 2,4U/mL, após aproximadamente 48 horas de fermentação.

Os principais efeitos das variáveis estudadas estão apresentados em forma de Gráficos de Pareto para os tempos de 48 e 72 horas de fermentação. A análise estatística dos dados em 96 horas de fermentação não são apresentados, pois o comportamento foi semelhante ao obtido em 48 e 72 horas de fermentação.

A Figura 4.4 apresenta o Gráfico de Pareto para 48 horas e a Figura 4.5 o Gráfico de Pareto para 72 horas de fermentação.

Pode-se observar, com 90% de confiança (Figura 4.4), que o óleo de oliva mostrou efeito significativo negativo, indicando que um nível menor de óleo contribui para maior atividade de lipase. O extrato de levedura e a peptona também apresentaram efeito significativo, as outras variáveis não apresentaram efeito.

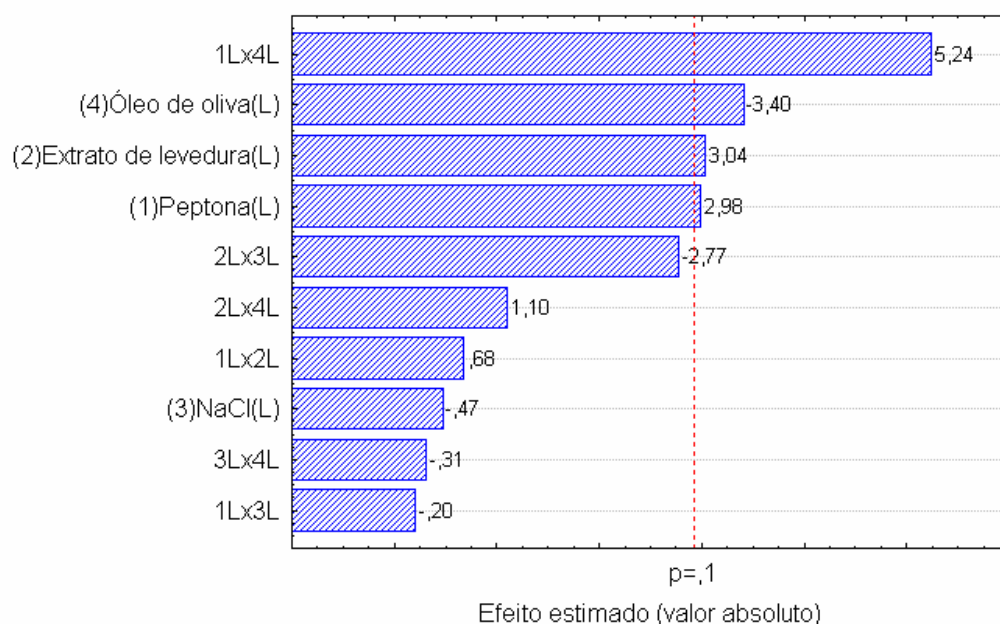


Figura 4.4. Gráfico de Pareto da produção de lipases utilizando microrganismo livre em 48 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental completo.

O mesmo comportamento pode ser observado no gráfico de Pareto para 72 horas de fermentação (Figura 4.5).

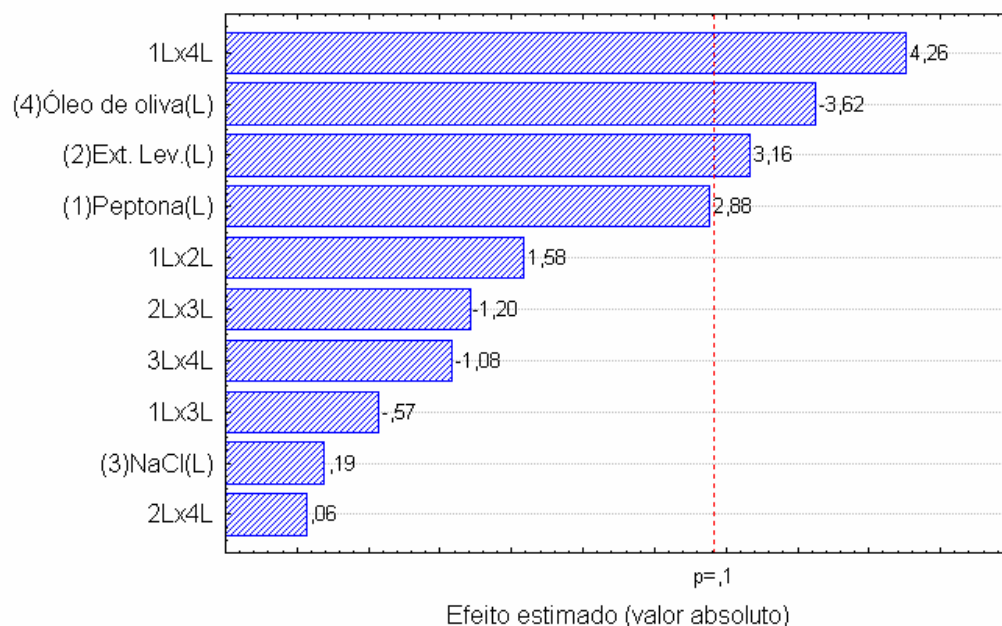


Figura 4.5. Gráfico de Pareto da produção de lipases utilizando microrganismo livre em 72 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental completo.

Para o tempo de 96 horas foi possível a validação de um modelo matemático empírico codificado, apresentado na Equação 4.1.

$$\text{Atividade enzimática} = 2,89 - 0,86.Peptona - 0,68.NaCl - 2,47.Óleo + 1,73Peptona.Óleo + 0,75.Ext.Levadura.Óleo \quad (4.1)$$

O modelo codificado foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 4.4. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (0,88) e o valor de F (F calculado maior que o F tabelado) validaram estatisticamente o modelo ($p < 0,05$) e permitiram a construção das superfícies de resposta apresentadas na Figura 4.6.

Na Figura 4.6 pode-se verificar que as menores concentrações dos componentes resultaram em uma maior produção da enzima.

Tabela 4.4. Análise de variância para a atividade lipásica com microrganismo livre.

Fontes de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	174,10	5,00	34,82	9,66
Resíduos	46,84	13,00	3,60	
Falta de ajuste	46,41	11,00		
Erro Puro	0,43	2,00		
Total	220,94	18,00		

F tabelado = 3,02;

Coeficiente de correlação: R= 0,88.

Verifica-se também na Figura 4.6(a) que o óleo de oliva 1%(m/v) e o NaCl 0,5%(m/v) foram as concentrações que resultaram em uma maior produção da enzima.

Na Figura 4.6(b) uma região ótima é compreendida entre a concentração de NaCl 0,5 a 1,6%(m/v) e de peptona 1 a 3,5%(m/v) aproximadamente. Na Figura 4.6(c) observa-se que o óleo de oliva em 1%(m/v) e concentração de peptona 2%(m/v) foram as concentrações na qual encontram-se os melhores resultados para atividade lipásica.

A apresentação de uma região ótima é de extrema importância também do ponto de vista industrial, pois permite que a produção da enzima seja realizada em uma faixa de concentração dos componentes, permitindo oscilações destas no processo, dentro da área estudada.

Estes resultados também são interessantes do ponto de vista industrial se visto por motivos econômicos, justamente pelo fato de as menores concentrações dos componentes terem proporcionado as maiores atividades lipásicas.

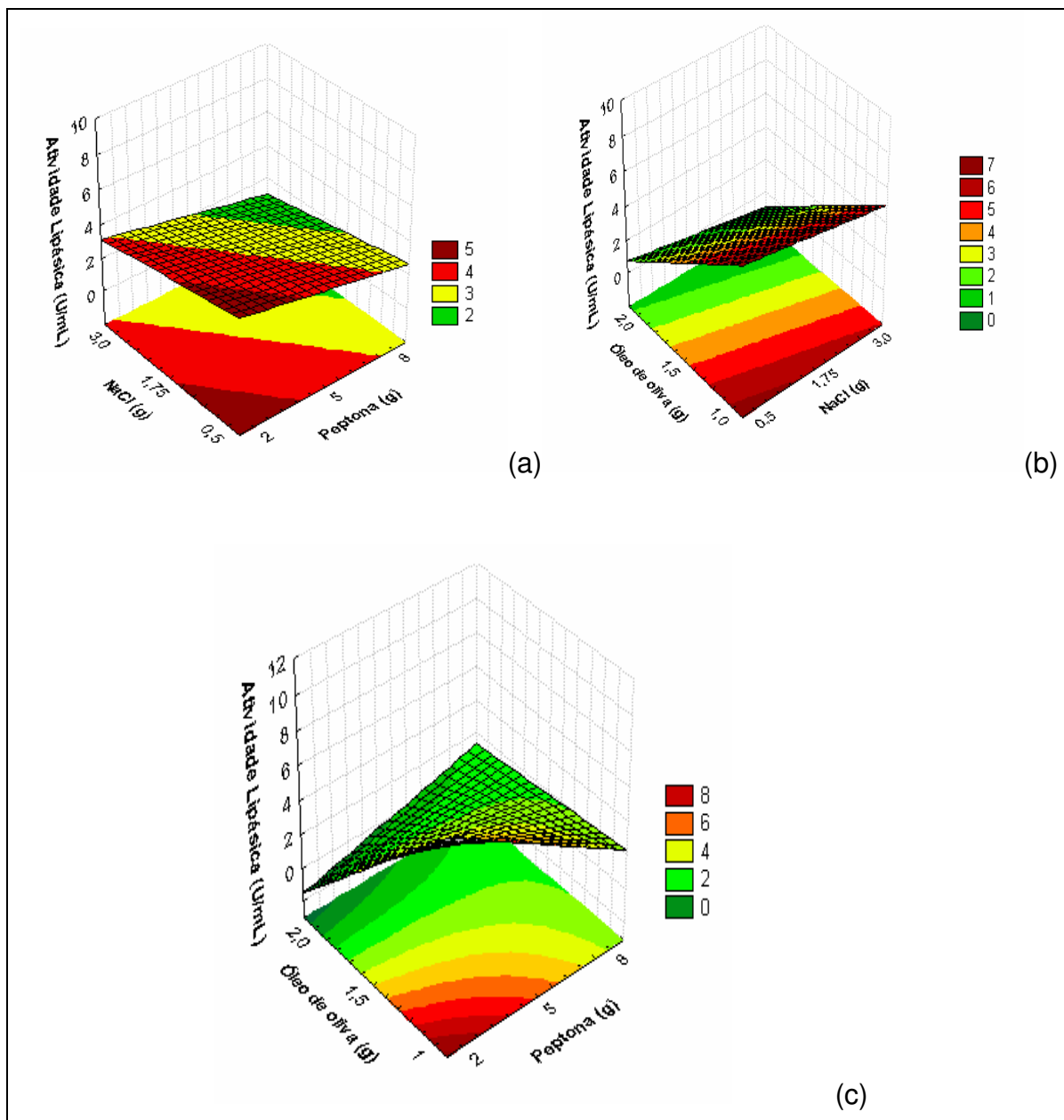


Figura 4.6 Superfícies de resposta do comportamento da atividade enzimática em função da (a) concentração do óleo de oliva e NaCl, (b) concentração de NaCl e peptona e (c) concentração de óleo de oliva e peptona.

O valor máximo de atividade lipásica obtida nesta etapa foi de 9,5U/mL em 96 horas de fermentação, sendo este maior que o encontrado por Kempka et al. (2008), que avaliaram a produção de lipase por *Penicillium verrucosum*, obtendo

um máximo de atividade de 3,15U/mL em 96 horas de fermentação. No entanto, é menor que a atividade lipásica de 12,55U/mL em 72 horas de fermentação obtida por Benjamin e Pandey (1997) utilizando *Candida rugosa*.

4.2. Estudo da produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Penicillium* sp. imobilizado

Com o intuito de maximizar a produção da enzima e acrescentar novas e melhores condições para produção de lipase, após ter-se maximizado as condições de produção com o microrganismo livre, partiu-se para o estudo da produção de lipase com o microrganismo imobilizado.

No entanto, a literatura encontrada em relação à imobilização de microrganismo para produção de lipases é escassa, mas as tendências existentes apresentam resultados promissores, tendo este fator instigado a consecução de estudos de imobilização do microrganismo visando a busca por aumento na atividade lipásica e maior resistência aos fatores que afetam o processo de produção da enzima.

4.2.1. Estratégia seqüencial de planejamento experimental para otimização da produção de lipase utilizando microrganismo imobilizado

Para o estudo da produção de lipase utilizando microrganismo imobilizado, foram realizados quatro planejamentos experimentais, que estão apresentados a seguir.

4.2.1.1. Primeiro planejamento experimental

As variáveis estudadas nesta etapa foram concentração de alginato de sódio, concentração de cloreto de cálcio, concentração de glutaraldeído e tempo de cura. A resposta avaliada foi a atividade lipásica no decorrer da fermentação. A Tabela 4.5 apresenta a matriz do planejamento experimental com os valores reais, codificados e as respostas para a atividade lipásica no decorrer da FS utilizando microrganismo imobilizado.

Tabela 4.5 Matriz do primeiro planejamento experimental completo de 16 ensaios com as respostas da atividade lipásica no decorrer da FS utilizando microrganismo imobilizado.

Ensaio	X1	X2	X3	X4	AL (U/ml) 24h	AL (U/ml) 48h	AL (U/ml) 72h	AL (U/ml) 96h	AL (U/ml) 120h
1	-1(2)	-1(0)	-1(0,2)	-1(6)	0,97	0,67	0	0	0
2	+1(4)	-1(0)	-1(0,2)	-1(6)	1,63	2,03	2,93	3,01	2,23
3	-1(2)	+1(2)	-1(0,2)	-1(6)	0,97	7,79	11,36	5,19	3,36
4	+1(4)	+1(2)	-1(0,2)	-1(6)	0,92	1,16	9,44	12,81	3,98
5	-1(2)	-1(0)	+1(2)	-1(6)	0	0	0	0	0
6	+1(4)	-1(0)	+1(2)	-1(6)	0	0	0	0	0
7	-1(2)	+1(2)	+1(2)	-1(6)	0,81	0,97	5,12	4,12	2,95
8	+1(4)	+1(2)	+1(2)	-1(6)	0	0	0	0	0
9	-1(2)	-1(0)	-1(0,2)	+1(24)	0,91	4,16	5,12	4,2	0
10	+1(4)	-1(0)	-1(0,2)	+1(24)	0	0	0	0	0
11	-1(2)	+1(2)	-1(0,2)	+1(24)	0,59	1,45	2,14	6,2	0
12	+1(4)	+1(2)	-1(0,2)	+1(24)	0	0	0	0	0
13	-1(2)	-1(0)	+1(2)	+1(24)	0	0	0	0	0
14	+1(4)	-1(0)	+1(2)	+1(24)	0	0	0	0	0
15	-1(2)	+1(2)	+1(2)	+1(24)	0	0	0	0	0
16	+1(4)	+1(2)	+1(2)	+1(24)	0	0	0	0	0
17*	0(3)	0(1)	0(1,1)	0(15)	1,63	2,40	1,02	0	0
18*	0(3)	0(1)	0(1,1)	0(15)	1,60	2,38	1,12	0	0
19*	0(3)	0(1)	0(1,1)	0(15)	1,69	2,93	1,24	0	0
**Controle					4,27	5,41	6,20	6,31	3,54

*Ponto Central;

**Fermentação controle, microrganismo livre (Peptona 2% m/v, cloreto de sódio 0,5% m/v, Extrato de levedura 0,5% m/v, e óleo de oliva 1% m/v, temp. 28°C; Onde: X1= Alginato de sódio (%m/v), X2= Glutaraldeído (%v/v), X3=CaCl₂ (%m/v), X4= Tempo (H). AL= Atividade Lipásica (U/mL).

Na última linha da matriz encontra-se o valor de atividade lipásica da fermentação controle, realizada com o microrganismo livre.

Verifica-se que a maior atividade enzimática foi obtida em 96 horas de fermentação, correspondente ao ensaio 4 (12,81U/mL).

A produção de lipase foi máxima com a concentração 4%(m/v) de alginato de sódio, seguida pela concentração 2%(m/v) de alginato de sódio no ensaio 3 com 11,36U/mL, o que pode ser explicado pelos efeitos de interações.

As cápsulas com concentração 2%(m/v) de alginato de sódio apresentaram atividade lipásica com valores muito próximos a dos grânulos formados com concentração 4%(m/v), cabendo mencionar que estes dissolveram no meio de produção depois de 48 horas, e em se tratando de células imobilizadas é interessante e imprescindível que os grânulos se mantenham inteiros.

A produção de lipase também foi máxima nos tempos de cura (a 5°C, em solução CaCl_2) de 6 horas, tempo que proporcionava resistência à cápsula dos grânulos.

A diminuição da atividade lipásica nos tempos de 24 horas pode ser devido à cápsula ter adquirido resistência à transferência de massa.

Os dados obtidos na matriz apresentada na Tabela 4.5 foram tratados estatisticamente para o tempo de 48, 72 e 96 horas de fermentação e estão apresentados em forma de Gráfico de Pareto na Figura 4.7, 4,8 e 4,9, respectivamente.

Observou-se que, com 95% de confiança (Figura 4.7), a variável concentração de CaCl_2 apresentou efeito significativo negativo sobre a produção de lipase, bem como a concentração de alginato de sódio e a interação entre a concentração de glutaraldeído e o tempo de cura, significando que, dentro da faixa estudada, as menores concentrações desses componentes resultaram em maiores atividades de lipase.

A variável concentração de glutaraldeído e as outras interações não apresentaram efeitos significativos.

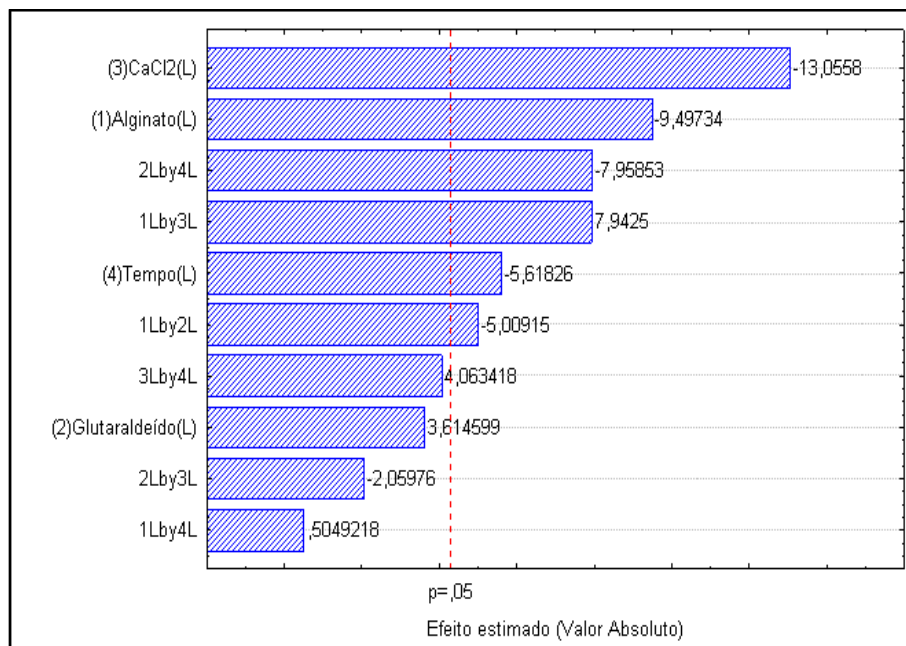


Figura 4.7. Gráfico de Pareto da produção de lipases utilizando microrganismo imobilizado em 48 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental completo.

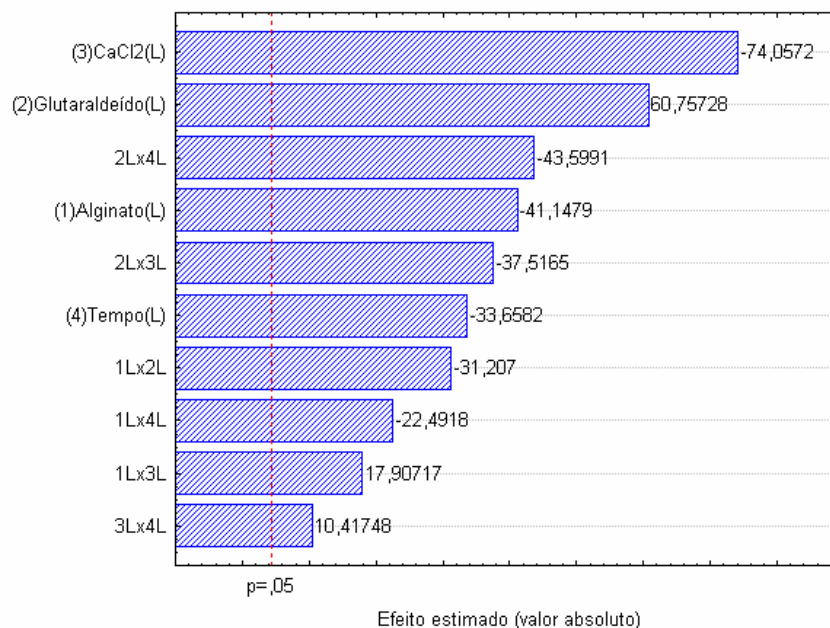


Figura 4.8. Gráfico de Pareto da produção de lipases utilizando microrganismo imobilizado em 72 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental completo.

Através da Figura 4.8 pode se observar que todas as variáveis apresentaram efeito no processo, e o glutaraldeído apresentou efeito positivo, indicando que maiores concentrações proporcionam melhores atividade de lipase. O mesmo comportamento foi observado para 96 horas de fermentação (Figura 4.9).

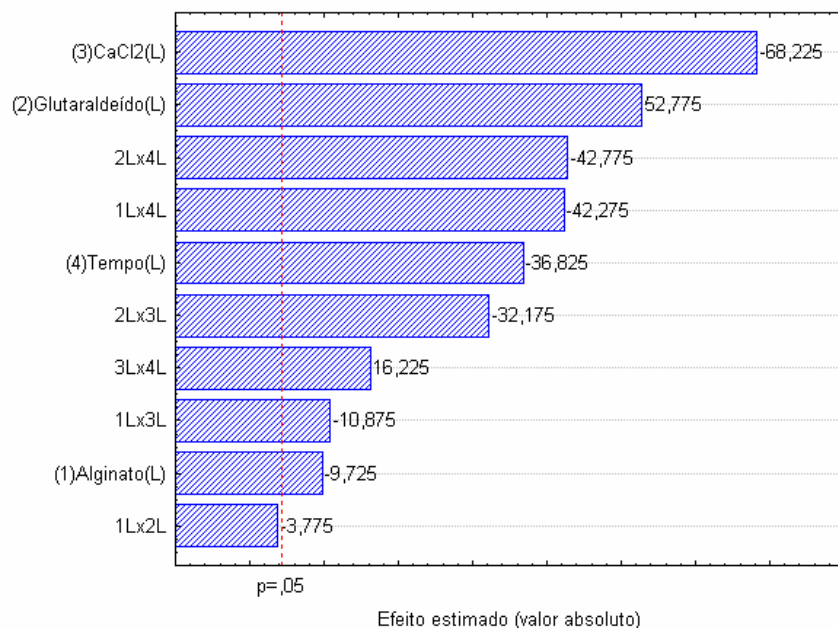


Figura 4.9. Gráfico de Pareto da produção de lipases utilizando microrganismo imobilizado em 96 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental completo.

Cabe ressaltar a necessidade de uma condição que resulte em grânulos perfeitos morfologicamente e difusibilidade satisfatória que proporcione o contato dos nutrientes do meio de fermentação com a célula microbiana para conseqüente produção e liberação do produto da fermentação, neste caso, as lipases.

4.2.1.2. Segundo planejamento experimental

Com base nas conclusões obtidas no primeiro planejamento realizou-se um segundo planejamento experimental completo, deslocando os níveis das variáveis, os quais estão apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Matriz do segundo planejamento experimental completo de 16 ensaios com as respostas da atividade lipásica no decorrer da FS utilizando microrganismo imobilizado.

Ensaio	X1	X2	X3	X4	AL (U/ml) 24h	AL (U/ml) 48h	AL (U/ml) 72h	AL (U/ml) 96h	AL (U/ml) 120h
1	-1(2)	-1(0,5)	-1(0,2)	-1(1)	6,32	6,80	4,32	2,31	0
2	+1(3)	-1(0,5)	-1(0,2)	-1(1)	0,81	0,32	0	0	0
3	-1(2)	+1(1,5)	-1(0,2)	-1(1)	0,48	5,61	5,61	2,46	0
4	+1(3)	+1(1,5)	-1(0,2)	-1(1)	0	3,52	9,76	13,08	11,02
5	-1(2)	-1(0,5)	+1(0,8)	-1(1)	3,36	4,64	7,84	3,68	0
6	+1(3)	-1(0,5)	+1(0,8)	-1(1)	0	0	0	0	0
7	-1(2)	+1(1,5)	+1(0,8)	-1(1)	0	1,12	2,24	0,80	0
8	+1(3)	+1(1,5)	+1(0,8)	-1(1)	0	0	0	0	0
9	-1(2)	-1(0,5)	-1(0,2)	+1(11)	0	0,32	0	0	0
10	+1(3)	-1(0,5)	-1(0,2)	+1(11)	0	2,08	2,96	3,04	0
11	-1(2)	+1(1,5)	-1(0,2)	+1(11)	0	5,28	6,88	8,99	7,98
12	+1(3)	+1(1,5)	-1(0,2)	+1(11)	1,44	1,60	5,28	12,48	11,21
13	-1(2)	-1(0,5)	+1(0,8)	+1(11)	0	0	0	0	0
14	+1(3)	-1(0,5)	+1(0,8)	+1(11)	0,32	0	0	0	0
15	-1(2)	+1(1,5)	+1(0,8)	+1(11)	0	0	0,16	0	0
16	+1(3)	+1(1,5)	+1(0,8)	+1(11)	0	0	2,40	3,68	0
17*	0(2,5)	0(1)	0(0,6)	0(6)	1,31	5,28	11,91	12,89	11,98
18*	0(2,5)	0(1)	0(0,6)	0(6)	1,28	5,44	12,10	13,18	12,0
19*	0(2,5)	0(1)	0(0,6)	0(6)	1,61	5,36	12,32	12,80	11,79
**Controle					3,23	5,34	7,83	8,58	-

* Ponto central;

**Fermentação controle, microrganismo livre (Peptona 2% m/v, cloreto de sódio, 0,5% m/v, Extrato de levedura 0,5% m/v, e óleo de oliva 1% m/v, temp. 28°C;

Onde: X1= Alginato de sódio (%m/v), X2= Glutaraldeído (%v/v), X3=CaCl₂ (%m/v), X4= Tempo. AL= Atividade Lipásica (U/mL).

Observa-se na Tabela 4.6 que a produção máxima de lipase foi alcançada em 96 horas na maioria dos ensaios experimentais, com maior atividade lipásica em torno de 13,18U/mL no ponto central.

Observa-se também que o ensaio 4, com concentração de alginato de sódio de 3%(m/v), apresentou atividade lipásica de 13,08U/mL, sendo este um valor bem semelhante ao do ponto central. Esse comportamento novamente pode ser explicado pelos efeitos de interação.

Resultados de maior atividade lipásica com 3%(m/v) de alginato de sódio, estão de acordo com os obtidos por Ellaiah et al. (2004), utilizando *Aspergillus niger*.

Cabe ressaltar que os ensaios 1, 3, 5 e 11 apresentados na matriz, obtiveram atividade lipásica, mas em determinados tempos os grânulos “desmancharam” no meio de fermentação. No entanto, na condição do ponto central com concentração 2,5%(m/v) de alginato de sódio, 6 horas de tempo de cura e 1%(m/v) de glutaraldeído este fato não ocorreu.

No Gráfico de Pareto de 72 horas de fermentação (Figura 4.10), estão apresentados os efeitos das variáveis na produção de lipase por FS utilizando *Penicillium* sp. imobilizado.

Observa-se que praticamente todas as interações influenciaram no processo de produção da enzima.

A variável concentração de CaCl_2 apresentou efeito significativo negativo, representando que a menor concentração deste componente resulta em maior atividade lipásica.

A concentração de glutaraldeído apresentou efeito positivo, representando que, dentro da faixa estudada, uma maior concentração deste componente, conduz à maior produção da enzima.

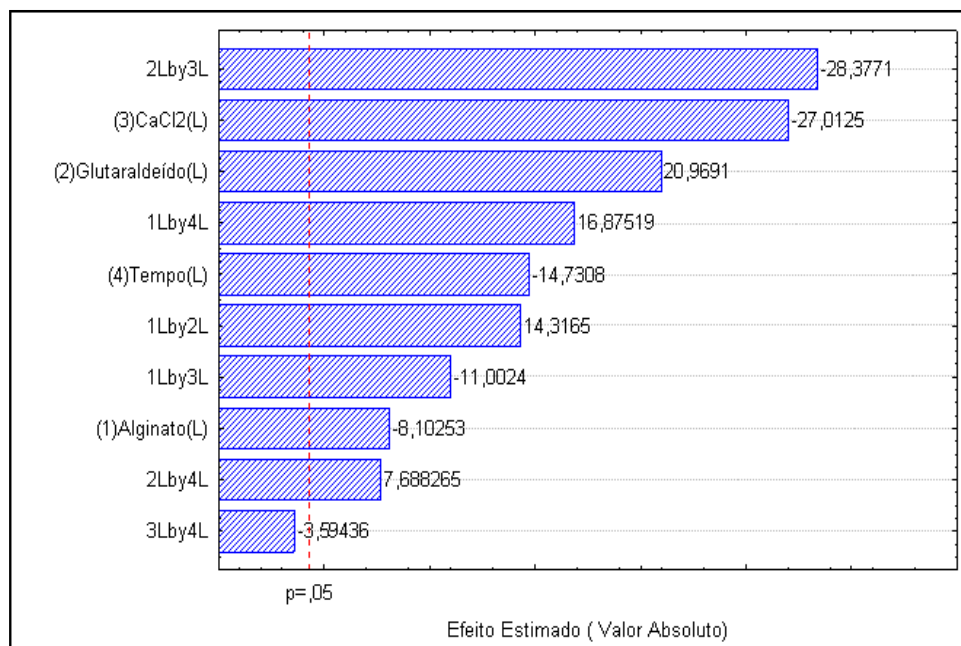


Figura 4.10. Gráfico de Pareto da produção de lipases utilizando microrganismo imobilizado em 72 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental completo.

4.2.1.3. Terceiro planejamento experimental

Tendo como base os resultados obtidos no segundo planejamento experimental, a Tabela 4.7 apresenta a matriz com os resultados obtidos no terceiro planejamento experimental completo 2^3 de 11 ensaios, onde foram fixados os níveis de alginato de sódio em 2,5%(m/v) e CaCl_2 em 0,2%(m/v), variando a concentração de glutaraldeído entre 0,8 e 2,2 %(v/v) e o tempo de cura entre 1,7 e 10,2 horas.

Verifica-se pela Tabela 4.7 que a maior atividade enzimática foi obtida em 120 horas de fermentação, no ensaio NUMERO 8 (20,09U/mL).

Esta condição tem como características 6 horas de tempo de cura dos grânulos e 1,5%(v/v) de glutaraldeído.

Em relação ao primeiro planejamento experimental, realizado com o microrganismo imobilizado, é possível perceber que houve um incremento bastante significativo na atividade enzimática.

A atividade enzimática máxima obtida passou de 12,81U/mL para 20,09U/mL, o que corresponde a um aumento de praticamente 100% na atividade de hidrólise.

Tabela 4.7 Matriz do terceiro planejamento experimental completo de 11 ensaios com as respostas da atividade lipásica no decorrer da FS utilizando microrganismo imobilizado.

Ensaio	X1	X2	AL (U/mL) 24h	AL (U/mL) 48h	AL (U/mL) 72h	AL (U/mL) 96h	AL (U/mL) 120h
1	-1 (1)	-1(3)	0	2,90	5,80	6,72	6,70
2	1 (2)	-1 (3)	0	0	7,04	13,6	11,21
3	-1 (1)	1 (9)	0,8	1,62	5,6	11,2	14,24
4	1 (2)	1 (9)	0	1,01	5,28	12,48	15,52
5	-1,41 (0,8)	0 (6)	0	2,08	5,6	12,0	13,0
6	1,41 (2,2)	0 (6)	0	0	4,44	10,88	19,2
7	0 (1,5)	-1,41 (1,7)	0	4,48	8,96	16,96	17,0
8	0 (1,5)	1,41(10,2)	0	0,4	5,60	12,8	20,09
9*	0 (1,5)	0 (6)	0	0,21	5,30	14,72	19,01
10*	0 (1,5)	0 (6)	0	0,16	5,12	14,48	19,61
11*	0 (1,5)	0 (6)	0	0,16	5,81	15,01	19,82
**Controle			4,64	5,12	10,08	9,76	5,19

* Ponto Central;

**Fermentação controle, microrganismo livre: Peptona 2% m/v, cloreto de sódio, 0,5% m/v, Extrato de levedura 0,5% m/v, e óleo de oliva 1% m/v, temp. 28°C;

Onde: X1= Glutaraldeído %v/v, X2= Tempo (horas); AL= Atividade lipásica.

O Gráfico de Pareto representado pela Figura 4.11 apresenta os efeitos das variáveis sobre a atividade lipásica, onde pode-se observar que praticamente todas as variáveis estudadas foram estatisticamente significativas a 5% de significância. Na Figura 4.12 estão expressos no Gráfico de Pareto, os efeitos das variáveis para 120 horas de fermentação, onde novamente pôde-se observar que praticamente todas as variáveis apresentaram efeito significativo $p(<0,05)$.

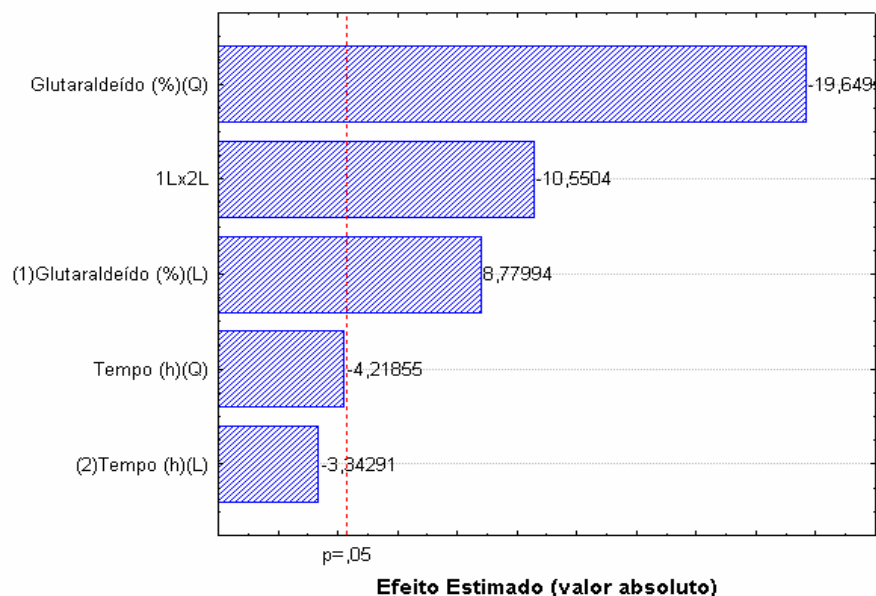


Figura 4.11. Gráfico de Pareto para produção de lipase por fermentação submersa utilizando microrganismo imobilizado em 96 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental completo.

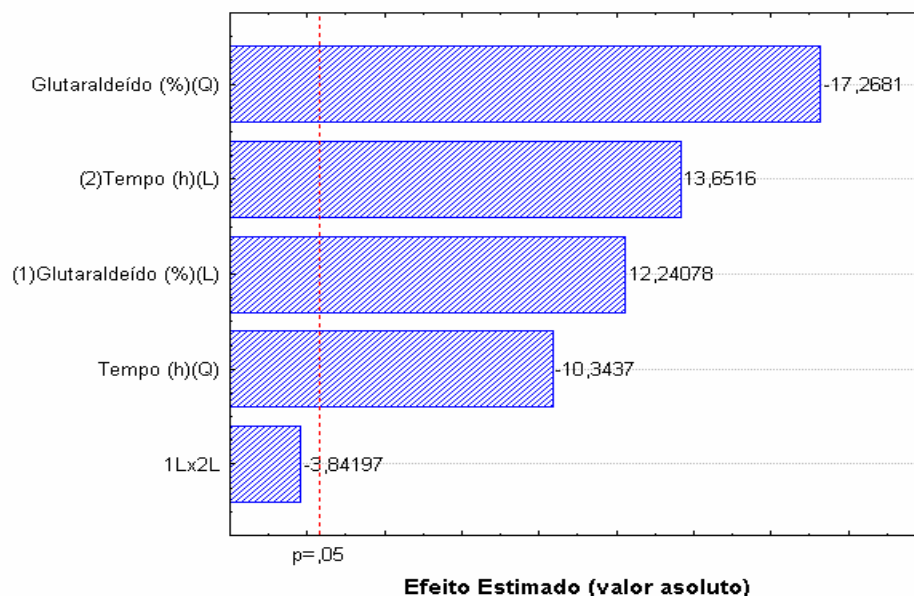


Figura 4.12. Gráfico de Pareto para produção de lipase por fermentação submersa utilizando microrganismo imobilizado em 120 horas de fermentação, em função das variáveis independentes estudadas: Planejamento experimental completo.

A variável concentração de glutaraldeído e tempo linear apresentaram efeito significativo positivo, indicando que maiores concentrações desse componente e maior tempo resultam em maiores valores de atividade lipásica.

Verificou-se também que os níveis de concentrações dos componentes estavam muito próximos, por isso resultou em resultados de atividade lipásica semelhantes.

4.2.1.4. Quarto planejamento experimental

Após análise dos resultados obtidos no terceiro planejamento experimental, verificou-se que em alguns ensaios a atividade lipásica apresentava valores muito semelhantes, provavelmente devido às faixas de concentrações dos componentes estarem bem estreitas.

Sendo assim, para otimizar a produção de lipase através do microrganismo imobilizado, foi realizado um quarto planejamento experimental completo, para identificar uma faixa de níveis mínimos e máximos para produção da enzima, como também para validar um modelo estatisticamente significativo.

A Tabela 4.8 apresenta a quarta matriz de planejamento experimental utilizando o microrganismo imobilizado, bem como os resultados obtidos para produção de lipase.

Foram mantidos os mesmos níveis utilizados no ponto central do terceiro planejamento experimental em relação à concentração de alginato de sódio (2,5%(m/v)) e CaCl_2 (0,2%(m/v)), variando os valores de concentração de glutaraldeído e tempo de cura.

Através da Tabela 4.8 observa-se que os maiores resultados de atividade alcançados se encontram no ponto central (20,96U/mL), condição que cabe mencionar corresponde à 1,5%(v/v) de glutaraldeído e 6 horas de tempo de cura. Cabe salientar que nesta condição experimental os grânulos permaneceram inteiros até o final da fermentação.

Tabela 4.8. Matriz do quarto planejamento experimental completo de 11 ensaios com as respostas da atividade lipásica no decorrer da FS utilizando microrganismo imobilizado.

Ensaio	X1	X2	AL (U/mL) 24h	AL (U/mL) 48h	AL (U/mL) 72h	AL (U/mL) 96h	AL (U/mL) 120h
1	-1 (0,4)	-1 (1,9)	0	1,10	1,88	9,01	9,0
2	1 (2,6)	-1 (1,9)	0	0,61	0,94	3,91	4,98
3	-1 (0,4)	1 (10,1)	0	1,44	3,01	9,78	10,01
4	1 (2,6)	1 (10,1)	0	0,12	1,08	5,76	5,76
5	-1,41 (0)	0 (6)	0,64	2,41	5,10	2,86	2,98
6	1,41 (3)	0 (6)	0	0,64	0,71	1,00	1,02
7	0 (1,5)	-1,41(0,25)	0	3,99	7,00	16,01	16,00
8	0 (1,5)	1,41(11,75)	0	5,28	7,78	16,90	16,02
9*	0 (1,5)	0 (6)	0	7,2	10,24	22,56	20,96
10*	0 (1,5)	0 (6)	0	7,0	10,01	22,00	20,01
11*	0 (1,5)	0 (6)	0	7,8	10,66	21,98	19,51
**Controle			3,52	5,12	7,84	9,76	6,00

* Ponto Central;

**Fermentação controle, microrganismo livre: (Peptona 2% m/v, cloreto de sódio, 0,5% m/v, Extrato de levedura 0,5% m/v, e óleo de oliva 1% m/v, temp. 28°C;

Onde: X1= Glutaraldeído (%v/v), X2= Tempo (horas); AL= Atividade lipásica.

Ellaiah et al. (2004) produziram lipase por imobilização de células de *Aspergillus niger* em três diferentes suportes. A fermentação submersa foi conduzida em frascos agitados (200rpm) e 28°C, por até 120 horas. Os resultados obtidos pelos referidos autores em 96 horas de fermentação foram, 4,09U/mL utilizando células livres, 4,22U/mL utilizando células imobilizadas em alginato de sódio a 3% (m/v), 3,85U/mL utilizando K-carragena e 4,07U/mL para células imobilizadas em poliacrilamida.

A Equação 4.2 apresenta o modelo codificado otimizado para a produção da enzima em função da concentração de glutaraldeído e do tempo de cura, o qual foi avaliado pela análise de variância apresentada na Tabela 4.9.

$$\text{Atividade lipásica (U/ml)} = 22,18 - 1,47.\text{Glutaraldeído(L)} - 10,69.\text{Glutaraldeído(Q)} + 0,48.\text{Tempo(L)} - 0,38.\text{Tempo (Q)} + 0,27.\text{Glutaraldeído(L).Tempo(L)}.$$

(4.2)

O coeficiente de correlação obtido (0,97) e o valor de F validaram estatisticamente o modelo ($p < 0,05$) e permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 4.13.

Tabela 4.9. Análise de variância para a atividade lipásica com microrganismo imobilizado.

Fontes de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	658,18	3	219,39	97,15
Resíduos	15,80	7	2,25	
Falta de ajuste	15,58	5		
Erro Puro	0,21	2		
Total	673,99	10		

F tabelado = 4,34;

Coeficiente de correlação: $R = 0,97$.

Através da superfície de resposta e da curva de contorno apresentada na Figura 4.13, observa-se que uma região ótima é compreendida para os tempos de cura entre 5 e 7 horas e concentração de glutaraldeído de 1 a 2% (v/v), 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 para as variáveis independentes, ocorreu uma tendência à diminuição da atividade da enzima.

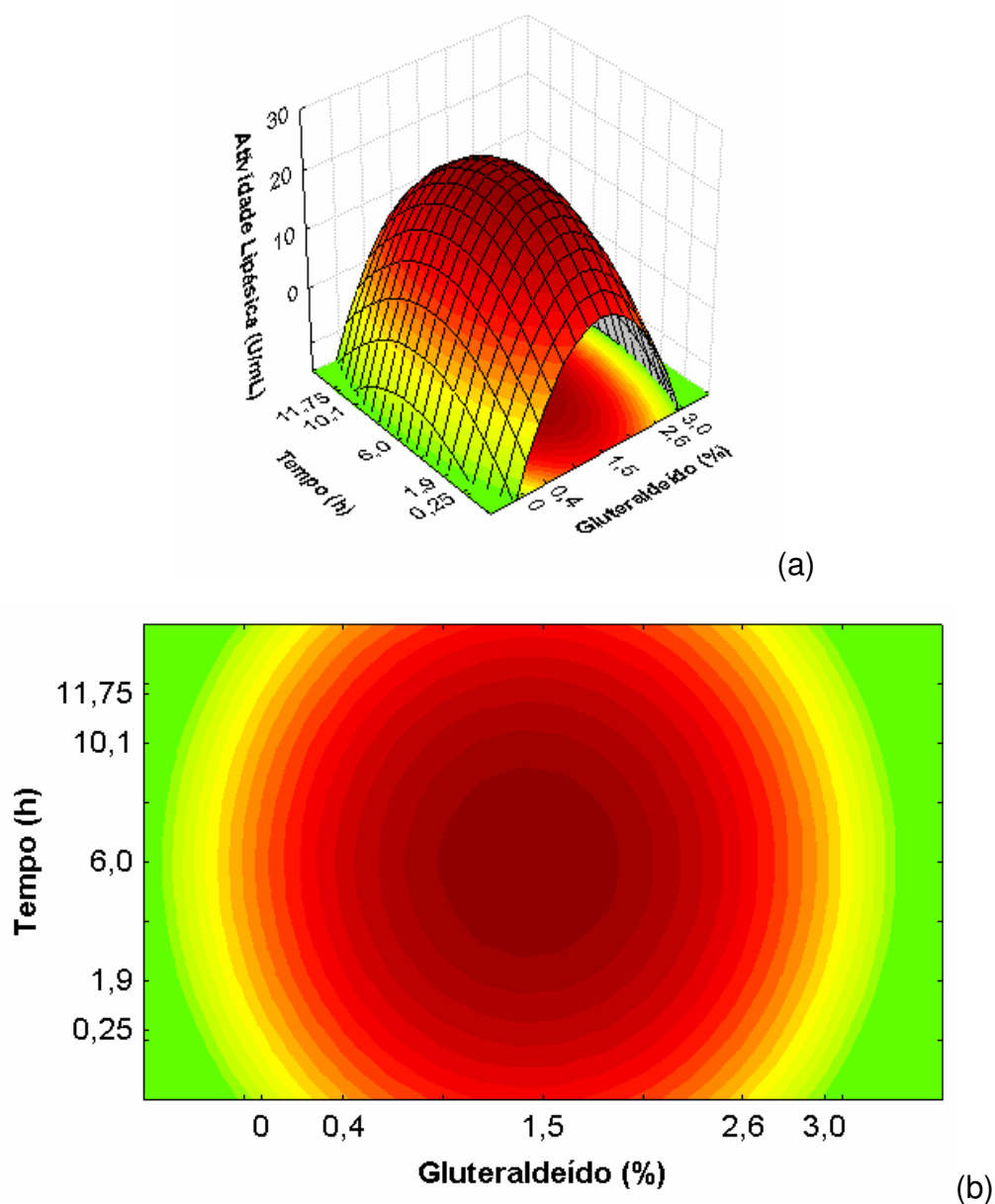


Figura 4.13 Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para produção de lipases utilizando *Penicillium* sp. imobilizado.

Hemachander et al. (2001) obtiveram da imobilização de células de *Ralstonia pickettii* para produção de lipases em diferentes matrizes, em 120 horas de fermentação, 8,5U/mL em imobilização em ágar, 14U/mL em alginato de sódio a 4%(m/v) e 24,75U/mL em poliacrilamida. Benjamin e Pandey (1997) utilizaram *Candida rugosa* imobilizada para produção de lipases em reator de leito

empacotado e obtiveram 17,94 U/mL com células imobilizadas em alginato de cálcio.

A Figura 4.14 ilustra formato dos grânulos do microrganismo imobilizado em gel de alginato de sódio, utilizado neste trabalho.

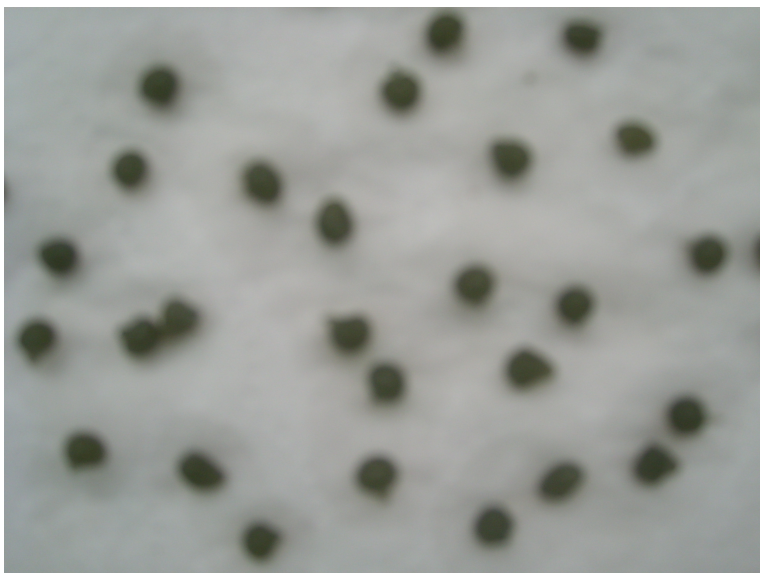


Figura 4.14. Grânulos de *Penicillium* sp. imobilizado em alginato de sódio.

A Figura 4.15 ilustra o microrganismo imobilizado, imerso em glutaraldeído e pronto para ser lavado e transferido para o meio de produção.



Figura 4.15. Microrganismo imobilizado imerso em solução de glutaraldeído.

4.3 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS OBTIDOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO *Penicillium* sp.

4.3.1. Microrganismo Livre

4.3.1.1. Temperatura e pH ótimos

Foi realizada a determinação dos valores de temperatura e pH ótimos do extrato enzimático bruto obtido por fermentação submersa do *Penicillium* sp. livre, através da realização de um planejamento fatorial 2^2 completo com 4 pontos axiais e mais 3 pontos centrais.

A matriz do planejamento experimental, bem como os resultados de atividade lipásica, é apresentada na Tabela 4.10.

Tabela 4.10. Matriz do planejamento experimental completo para avaliação de temperatura e pH ótimos (valores codificados e reais) com as respostas da atividade de lipase para o microrganismo livre.

Ensaio	pH	T (°C)	Ativ. lipásica (U/mL)
1	- 1(5,5)	- 1(32)	11,08
2	- 1(5,5)	+ 1(42)	11,28
3	+ 1(8,5)	- 1(32)	1,86
4	+ 1(8,5)	+ 1(42)	1,01
5	0(7,0)	- 1,41(30)	10,30
6	0(7,0)	+ 1,41(44)	10,41
7	- 1,41(4,88)	0(37)	11,25
8	+ 1,41(9,11)	0(37)	1,96
9*	0(7,0)	0(37)	9,98
10*	0(7,0)	0(37)	9,18
11*	0(7,0)	0(37)	9,92

*Ponto Central.

Analisando as respostas obtidas na Tabela 4.10, observa-se que as maiores atividades de lipase foram obtidas nos ensaios 2 (11,28U/mL), 7

(11,25U/mL) e 1 (11,08U/mL), respectivamente, com pH 5,5, 4,88 e 5,5 e temperatura de 42, 37 e 32°C.

Os dados apresentados anteriormente foram tratados estatisticamente e os efeitos dos variáveis independentes na resposta estão expressos na forma de Gráfico de Pareto, conforme Figura 4.16.

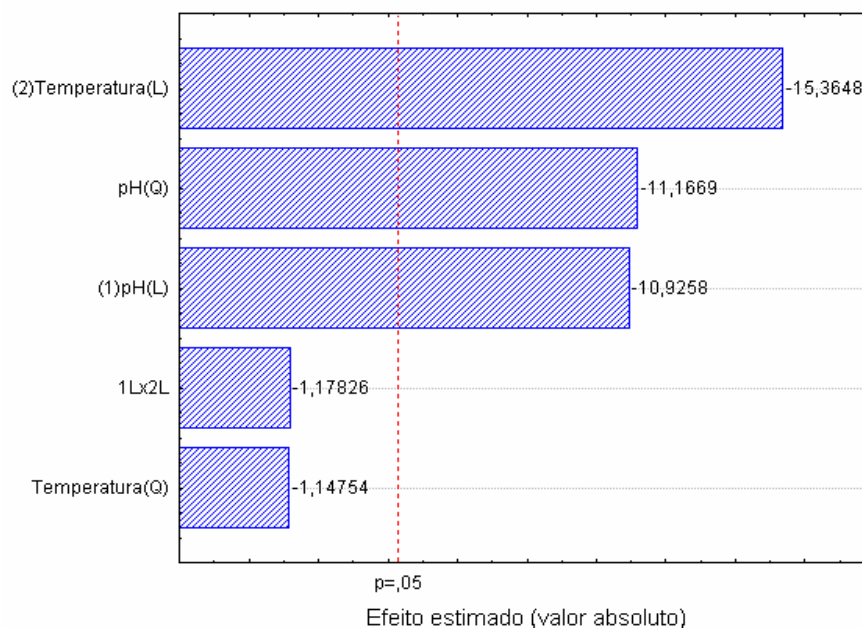


Figura 4.16 Gráfico de Pareto para determinação da temperatura e pH ótimos da atividade lipásica obtida com o microrganismo livre.

Com 95% de confiança observa-se que a temperatura e o pH apresentaram efeito significativo negativo, indicando que os menores níveis de temperatura e pH resultaram em maiores atividades lipásicas.

Os valores obtidos no estudo de definição do pH ótimo estão de acordo com os dados da literatura para outras lipases que apresentam valores de pH ótimo na faixa de 5,0 a 9,0 reportados, por exemplo, nos trabalhos de Martins (2001), Yang et al. (2005), Burkert (2002), Freire et al. (1997) e Pastore et al. (2003).

4.3.1.2. Temperatura de estabilidade

O extrato enzimático obtido utilizando *Penicillium* sp. livre foi incubado em diferentes tempos (de 30 a 480 minutos) e temperaturas de 25, 35, 45, 55 e 65 °C.

Os resultados de atividade lipásica do extrato bruto em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas estão apresentados na Figura 4.17.

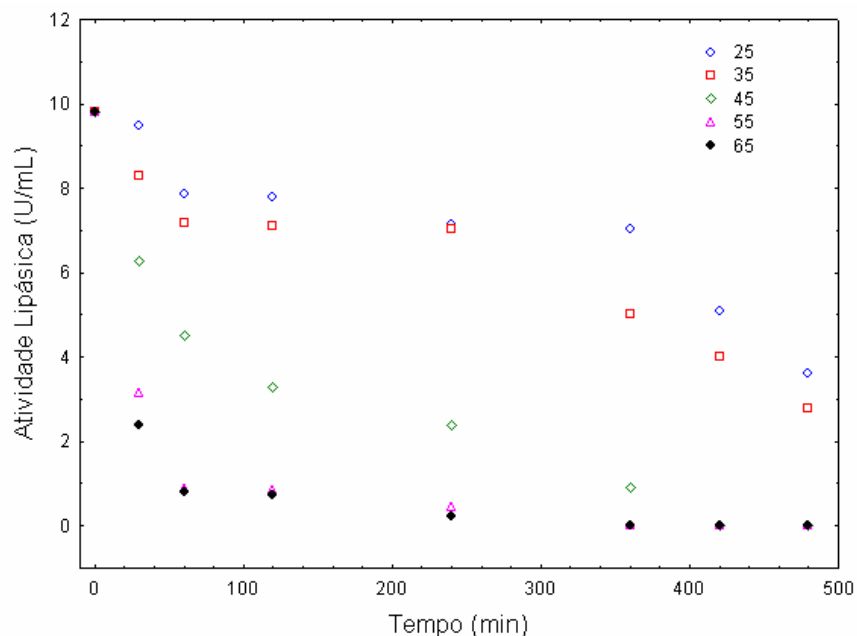


Figura 4.17 Atividade lipásica em função do tempo e da temperatura de incubação do extrato enzimático produzido por FS e *Penicillium* sp. livre.

Observa-se que a temperatura em que o extrato apresentou maior estabilidade encontra-se na faixa de 25 e 35 °C.

Cabe salientar que a atividade lipásica nessas temperaturas permaneceu por até 300 minutos com decaimento lento, e começou a demonstrar uma desnaturação acentuada a partir de 45 °C em todos os tempos, como mostrado na Figura 4.17.

4.3.1.3. pH de estabilidade

A estabilidade da lipase foi estudada incubando-se o extrato enzimático em diferentes valores de pH (4,88 – 8,5), em tampão fosfato de sódio 100mM e tampão tris HCl 100mM à 37°C. Os resultados são apresentados na Figura 4.18.

A estabilidade lipásica teve um decaimento linear em praticamente todos os tampões e manteve um decaimento moderado até aproximadamente 250 minutos, mas manteve atividade residual durante todo o tempo estudado.

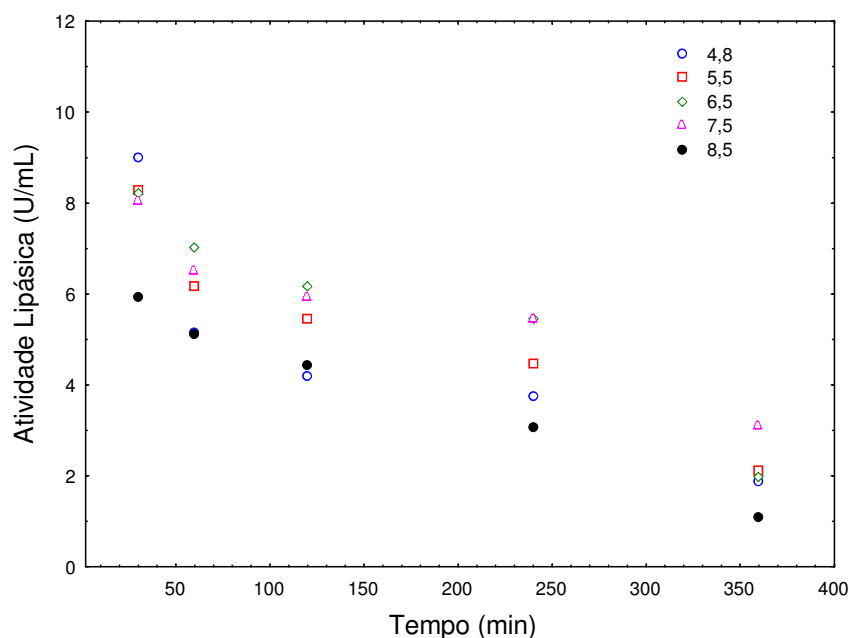


Figura 4.18 Atividade lipásica em função do tempo e do pH de incubação do extrato enzimático produzido por FS e *Penicillium* sp. livre.

A análise dos resultados demonstra que a lipase de *Penicillium* sp. apresenta uma maior estabilidade em pH entre 4,88 e 5,5. Pastore et al. (2003) verificaram que a lipase de *Rhizopus* sp. mostrou-se mais estável na faixa de valores de pH entre 5,6 e 8,0, e 6,5 e 7,5 em tampão tris-HCl para lipase de *Candida rugosa*.

Freire et al. (1997) encontraram para a lipase de *Penicillium restrictum* uma maior estabilidade no intervalo de pH de 7,0 até 8,0.

4.3.1.4. Estabilidade do extrato enzimático bruto armazenado à baixas temperaturas

A estabilidade do extrato enzimático foi avaliada conservando o extrato enzimático em temperatura de geladeira e de congelamento. O estudo da estabilidade é importante, pelo fato de permitir observar o comportamento da enzima e o percentual da atividade inicial mantida ao longo do armazenamento.

A seguir estão apresentados os comportamentos do extrato enzimático em temperatura de congelamento (-10 °C) e de geladeira (4 °C).

Estabilidade do extrato enzimático em temperatura de congelamento

O extrato bruto enzimático obtido a partir de *Penicillium* sp. foi estocado durante aproximadamente 6 meses em congelador, na temperatura de -10°C. Neste período foram determinadas as atividades enzimáticas em intervalos de tempos regulares a cada sete dias.

Na Figura 4.19 estão apresentados os resultados encontrados para o acompanhamento da atividade lipásica do extrato enzimático durante o armazenamento em temperatura de congelamento (-10°C) durante 177 dias.

De acordo com os valores apresentados na Figura 4.19, pode-se verificar que até o 42º dia de armazenamento, a atividade da lipase se manteve razoavelmente constante, e a partir desse dia até aproximadamente o 130º dia ocorreu um aumento na atividade lipásica. Após 134 dias de armazenamento o extrato enzimático teve sua atividade diminuída e continuou a cair até a inativação após 177 dias de armazenamento.

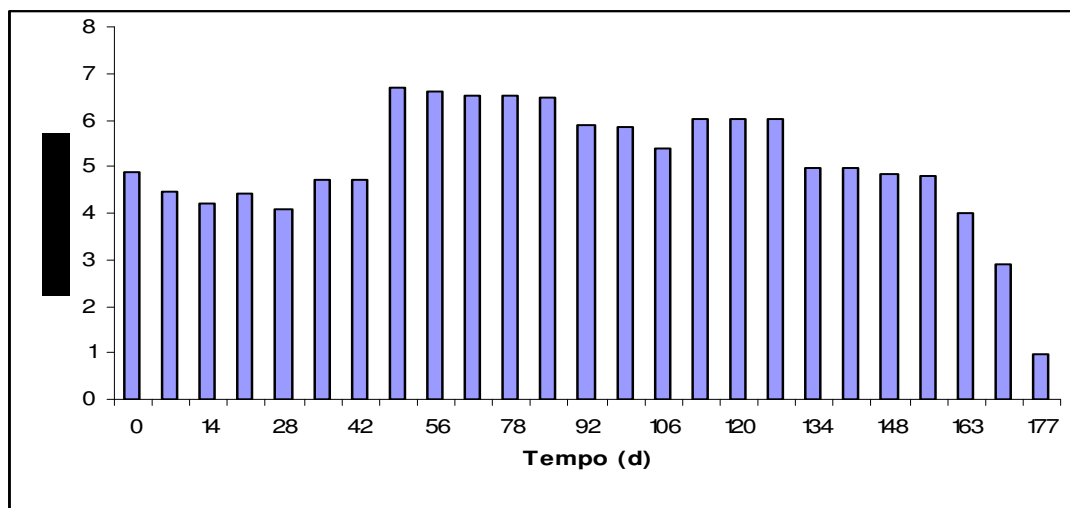


Figura 4.19. Estabilidade do extrato enzimático (obtido da fermentação utilizando microrganismo livre) armazenado em congelador (-10°C).

Estabilidade do extrato enzimático em temperatura de geladeira

O extrato enzimático bruto obtido a partir de *Penicillium* sp. livre foi estocado durante aproximadamente 6 meses, em geladeira na temperatura de 4°C. Neste período foram determinadas as atividades enzimáticas em intervalos de tempos regulares a cada sete dias

Na Figura 4.20 estão apresentados os resultados encontrados para o acompanhamento da atividade lipásica do extrato enzimático durante o armazenamento em geladeira (4°C) durante 141 dias.

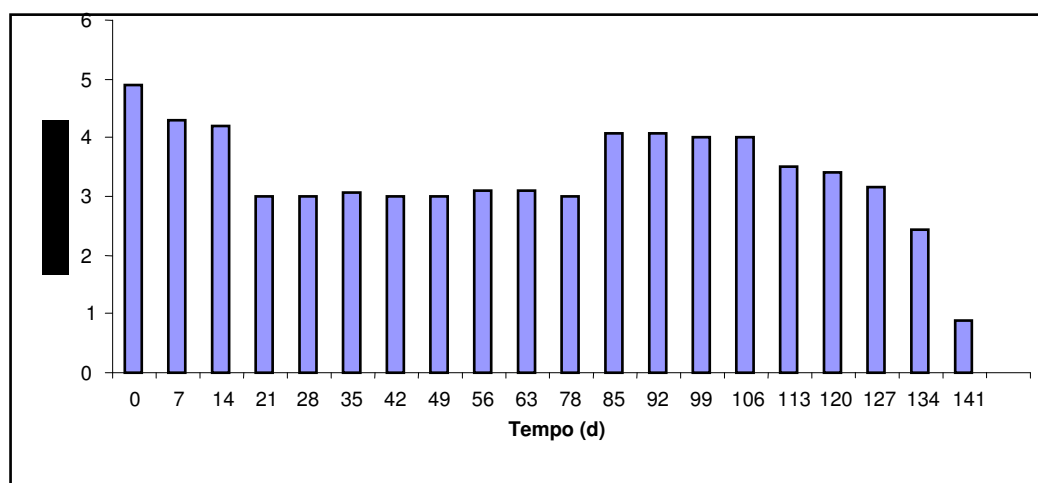


Figura 4.20. Estabilidade do extrato enzimático (obtido da fermentação utilizando microrganismo livre) armazenado em geladeira (4°C).

Pela análise da Figura 4.20 pode-se observar que a atividade lipásica teve queda até o 14° dia e depois mostrou-se estável até o 78° dia. Em seguida apresentou um pequeno aumento na atividade e no 141° dia perdeu completamente sua atividade.

Em comparação com o extrato concentrado armazenado em congelador pode-se concluir que o comportamento apresentado pelo extrato à temperatura de -10°C se mostrou razoavelmente mais estável. As duas formas de armazenamento apresentaram, em alguns momentos, diminuição da atividade e, em outros, aumento da atividade. Observou-se, portanto, que o extrato enzimático apresentou um comportamento variável em certos momentos do armazenamento, em relação à manutenção da sua atividade.

4.3.2 Microrganismo Imobilizado

4.3.2.1. Temperatura e pH ótimos

Foi realizada a determinação da temperatura e pH ótimos do extrato enzimático obtido por *Penicillium* sp. imobilizado através de um planejamento fatorial completo 2², com 4 pontos axiais e mais 3 pontos centrais.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.11, a qual mostra que a maior atividade lipásica ocorreu no ponto central (18,2U/mL), seguida pelos ensaios 6 e 2, respectivamente, com pH 7 e 5,5 e temperatura de 44 e 42°C.

No entanto, os ensaios 1, 5 e 7 com pH 5,5, 7,0 e 4,88 apresentaram atividade semelhante (14,61, 15,08 e 15,01U/mL), respectivamente, em temperaturas de 32, 30 e 37°C.

Pode-se observar também que em pH mais alcalino (9,11) a atividade lipásica foi diminuída. No entanto, é importante mencionar que o extrato enzimático obtido a partir do microrganismo imobilizado mostrou-se estável em uma ampla faixa de pH.

Comparando os valores de temperatura e pH ótimos obtidos com o extrato enzimático produzido utilizando o microrganismo livre, percebe-se que os dois extratos tiveram comportamento semelhante, mas o extrato obtido a partir do microrganismo imobilizado apresentou maior atividade lipásica em pH 7, e o obtido a partir de *Penicillium* sp. livre em pHs mais baixos.

Tabela 4.11. Matriz do planejamento experimental completo para avaliação de temperatura e pH ótimos (valores codificados e reais) com as respostas da atividade de lipase para o microrganismo imobilizado.

Ensaio	pH	T (°C)	Ativ.Lipásica(U/mL)
1	- 1(5,5)	- 1(32)	14,61
2	- 1(5,5)	+ 1(42)	15,58
3	+ 1(8,5)	- 1(32)	0,81
4	+ 1(8,5)	+ 1(42)	0,94
5	0(7,0)	- 1,41(30)	15,08
6	0(7,0)	+ 1,41(44)	16,0
7	- 1,41(4,88)	0(37)	15,01
8	+ 1,41(9,11)	0(37)	0
9*	0(7,0)	0(37)	18,2
10*	0(7,0)	0(37)	18,08
11*	0(7,0)	0(37)	17,81

*Ponto central.

Os dados da Tabela 4.11 foram tratados estatisticamente e os efeitos das variáveis expressos na forma de Gráfico de Pareto, apresentados na Figura 4.21.

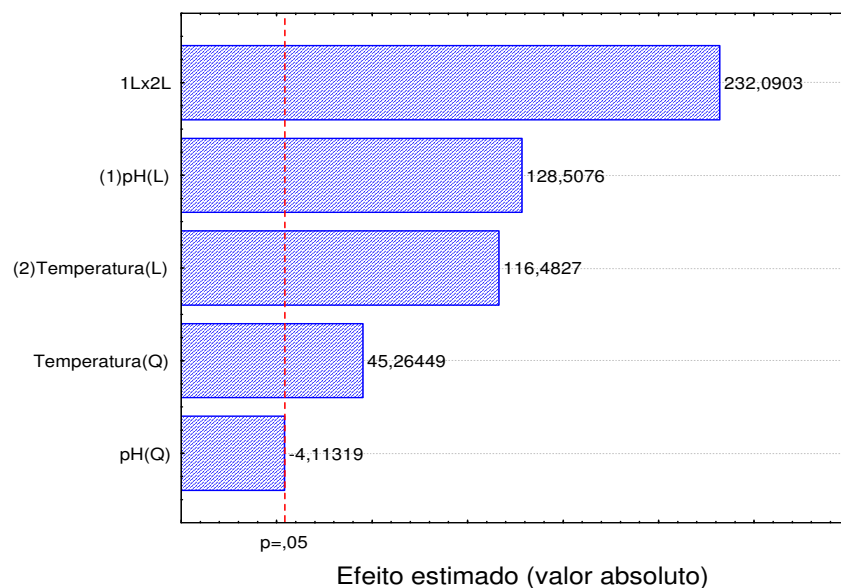


Figura 4.21. Gráfico de Pareto para determinação da temperatura e pH ótimos da atividade lipásica obtida com o microrganismo imobilizado.

4.3.2.2. Temperatura de estabilidade

O extrato enzimático obtido foi incubado em tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0 em diferentes temperaturas 25, 35, 45, 55 e 65°C. Os resultados obtidos de atividade lipásica no extrato em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas estão apresentados na Figura 4.22.

Como pode ser visualizado nesta figura, à medida que se aumenta a temperatura, menor é a estabilidade da lipase, constatando-se que o extrato enzimático obtido a partir do microrganismo imobilizado é mais estável à temperaturas mais baixas, como a de 25 e 35°C.

A atividade lipásica nessas temperaturas permaneceu por aproximadamente 120 minutos com decaimento lento, principalmente nas temperaturas mais baixas, e começou a demonstrar uma desnaturação acentuada a partir de 140 minutos de incubação, como mostrado na da Figura 4.22.

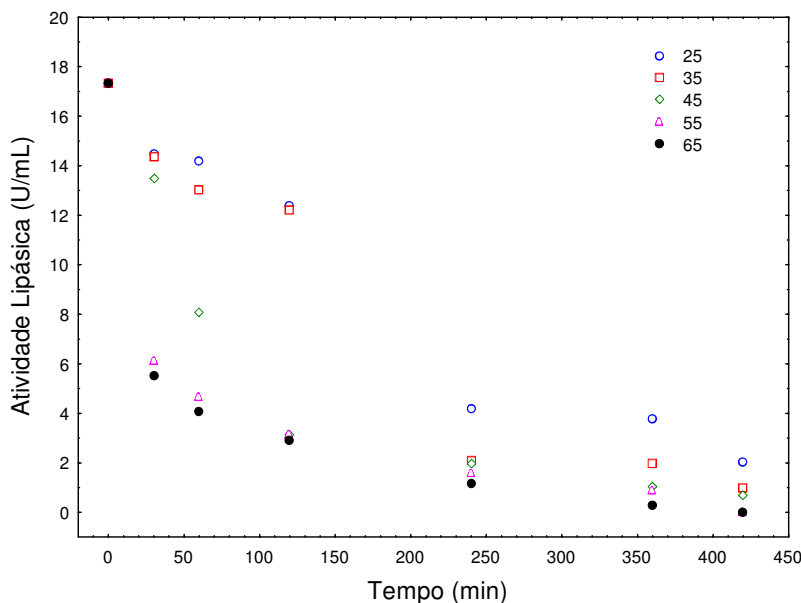


Figura 4.22. Atividade lipásica em função do tempo e da temperatura de incubação do extrato enzimático produzido por *Penicillium* sp. imobilizado.

Em uma avaliação global, percebe-se que os dois extratos enzimáticos (microrganismo livre e imobilizado), apresentaram comportamento semelhante.

Pode-se ressaltar que ambos apresentaram uma diminuição da atividade, no tempo zero de incubação e mantiveram comportamento semelhante em temperaturas de 25 e 35 °C.

No entanto, a partir das temperaturas de 45 °C, o extrato enzimático obtido a partir da fermentação utilizando o microrganismo livre, desnaturou levemente mais rápido a partir dos 240 minutos de incubação, enquanto o extrato obtido da fermentação utilizando o microrganismo imobilizado foi em uma pequena proporção mais estável nessas mesmas temperaturas.

4.3.2.3. pH de estabilidade

Para o estudo da influência do pH na atividade enzimática a 37 °C, utilizou-se tampão fosfato de sódio 100mM (pH 6,5 – 7,5) e tampão tris-HCl 100mM (pH 4,88, 5,5 e 8,8).

De acordo com os resultados obtidos, ilustrados na Figura 4.23, o extrato enzimático apresentou maior atividade lipásica em pH 4,88, 5,5 e 6,5,

respectivamente. Analisando o comportamento global do sistema, pode-se observar também que o extrato enzimático manteve atividade lipásica por até aproximadamente 350 minutos. Após 420 minutos de incubação, o maior valor de atividade lipásica apresentado foi de 6,01U/mL em pH 5,5.

Comparando a estabilidade ao pH para os dois extratos enzimáticos (microrganismo livre e imobilizado) obtidos, com base nas Figuras 4.18 e 4.23, pode observar-se que a atividade lipásica do extrato obtido através da fermentação utilizando o microrganismo livre, teve maior estabilidade em pH 5,5 e 7,5 por até 360 minutos. O extrato enzimático obtido a partir da fermentação utilizando *Penicillium* sp. imobilizado mostrou-se levemente mais estável em pH 5,5 e 6,5.

De maneira global, pode-se concluir que os dois extratos enzimáticos mostraram uma boa estabilidade durante o tempo de incubação estudado, de 0 a 360 minutos.

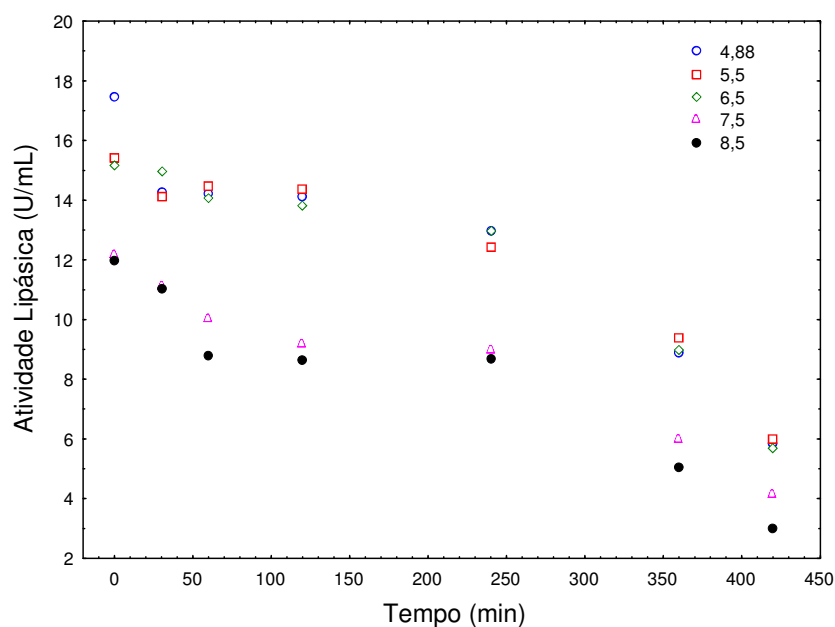


Figura 4.23. Atividade lipásica em função do tempo e do pH de incubação do extrato enzimático produzido por *Penicillium* sp. imobilizado.

Tan et al. (2003) analisaram a produção de lipases por fermentação submersa por *Candida sp.*, determinando 28°C e 7,0 como temperatura e pH ótimos, respectivamente.

A literatura reporta que o pH neutro é geralmente definido como ótimo para a atividade lipásica, com pode ser verificado nos trabalhos de Abbas et al. (2002), Burkert (2002), Kamini et al. (1998), Fadiloglu e Soylemez (1997) e Freire et al. (1997a).

Kempka et al. (2008) encontraram condições de temperatura de 30°C e pH 7,0 como melhor condição para produção de lipase por *Penicillium verrucosum*.

Alguns trabalhos relatam que a temperatura ótima para a atividade lipásica encontra-se na faixa de 37°C, como se verifica nos trabalhos realizados por Burkert (2002), Freire et al. (1997) e Benjamin e Pandey (2001).

Liu et al. (2006) estudaram as condições favoráveis para a atividade de lipase produzida por *Burkholderia sp.* e encontraram maior atividade de lipase em temperatura de 55°C e pH 9,0.

Pode-se notar que a temperatura ótima para a atividade lipásica encontra-se na faixa de 30°C a 40°C, conforme evidenciaram também os resultados obtidos por Abbas et al. (2002), Kolossvary (1996), Kamini et al. (1998), Fadiloglu e Soylemez (1997).

Pastore et al. (2003) obtiveram como melhor temperatura entre 40 e 55°C como a de maior estabilidade para a lipase produzida por *Rhizopus sp.*

Um estudo realizado por Burkert (2002) mostrou que a lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y552 diminui sua estabilidade à medida que se aumenta a temperatura, concluindo que a enzima é mais estável à baixas temperaturas, como a de 30°C. Maia et al. (2001) obtiveram a temperatura de 35°C como a de maior estabilidade para a lipase produzida por *Fusarium solani*. Kamini et al. (1998) verificaram que a lipase de *Aspergillus niger* apresentava estabilidade quando submetida a temperaturas de até 40°C. Shu et al. (2006) estabeleceram que a enzima de *Antrodia cinamomea* foi alcalina tolerante, na faixa de pH de 7-10, com ótima atividade em pH 8,0 e atividade e estabilidade diminuiram significativamente em valor de pH maior que 10. A atividade da enzima mostrou

ser estável em uma faixa de temperatura entre 25 – 60°C, com máxima atividade a 45°C.

Sharma et al. (2002) realizaram a caracterização de uma lipase alcalina termoestável de um novo *Bacillus* sp. RSJ-1 termofílico, e a caracterização exibiu máxima atividade a 50°C e pH 8,0 – 9,0. A enzima foi estável a 50°C por 60 minutos, mantendo mais de 90% de sua atividade original depois de 120 minutos. A meia vida a 55, 60, 65, 70 e 75°C foi 240, 150, 90 45, e 30 minutos respectivamente. A enzima foi também mais estável em faixa de pH 8,0 – 9,0 por 120 minutos.

Para fins de comparação entre a estabilidade térmica das lipases obtidas utilizando o microrganismo livre e imobilizado os dados obtidos experimentalmente foram graficados como $\ln A/A_0$ vs tempo e, desses gráficos, obteve-se o valor de K_d (constante de desativação térmica) para cada temperatura, como mostram as Tabelas 4.12 e 4.13. Com estes valores, graficou-se o $\ln K_d$ em função de $1/T$ (K) para cálculo de E_d (energia de ativação para reação de desnaturação), mostrado na Figura 4.24 para o extrato obtido utilizando o microrganismo livre e na Figura 4.25 para o extrato obtido utilizando o microrganismo imobilizado.

Tabela 4.12. Parâmetros cinéticos: Constante de desativação térmica (k) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) em função da temperatura para o extrato enzimático obtido com o microrganismo livre.

Temperatura (°C)	k (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)
25	0,0015	462,0
35	0,0019	364,7
45	0,0058	119,5
55	0,0405	17,1
65	0,0416	16,6

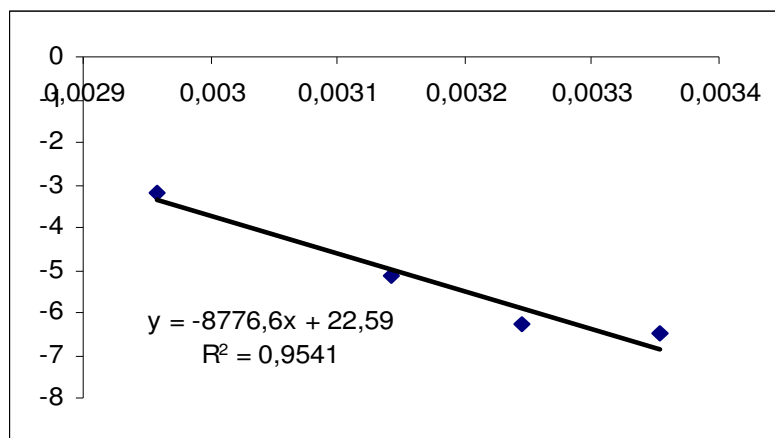


Figura 4.24. Gráfico linearizado para a equação de Arrhenius (microrganismo livre).

Tabela 4.13 Parâmetros cinéticos: Constante de desativação térmica (k) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) em função da temperatura para o extrato enzimático obtido com o microrganismo imobilizado.

Temperatura (°C)	k (h ⁻¹)	Tempo meia vida (min)
25	0,0048	144,4
35	0,0066	105,0
45	0,0074	93,6
55	0,0081	85,5
65	0,0109	63,6

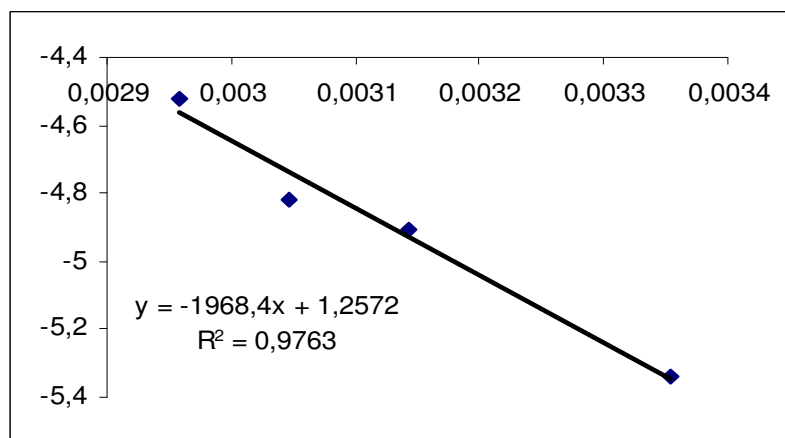


Figura 4.25. Gráfico linearizado para a equação de Arrhenius (microrganismo imobilizado).

Com os valores de Kd em função da temperatura graficou-se $\ln K_d$ em função do inverso da temperatura (Figuras 4.24 e 4.25) para o cálculo da energia de ativação para a reação de desnaturação (E_d), conforme Equação 4.3.

$$\ln K_d = \ln K_{d0} - E_d/RT \quad (4.3)$$

A partir da inclinação da reta obteve-se o valor de E_d , 128503,26 cal/mol.

A expressão utilizada para determinar os valores de Kd foi: K_d (teórico) = $K_{d0} \cdot \exp(-E_d/RT)$, sendo T= temperatura em Kelvin.

Os valores dos tempos de meia vida (min) foram calculados de acordo com a Equação 4.4, para as temperaturas estudadas.

$$t_{1/2} = \ln 0,5/K_d \quad (4.4)$$

Pode-se observar através desses dados que o tempo de meia vida da enzima obtida através do microrganismo imobilizado foi maior que a estabilidade da enzima obtida através da fermentação utilizando o microrganismo livre.

4.3.2.4. Estabilidade do extrato enzimático bruto armazenado à baixas temperaturas

A seguir são apresentados os comportamentos do extrato enzimático obtido com o microrganismo imobilizado em temperatura de congelamento (-10 °C) e de geladeira (4 °C). Sendo que o extrato enzimático obtido através do microrganismo imobilizado só foi armazenado durante 63 dias, tempo este em que acabou a quantidade de amostra incubada.

Estabilidade do extrato enzimático em temperatura de congelamento

O extrato enzimático bruto obtido a partir do microrganismo imobilizado foi estocado durante aproximadamente 60 dias na temperatura de -10°C.

Na Figura 4.26 estão apresentados os resultados encontrados para o acompanhamento da atividade lipásica em intervalos de tempos regulares a cada sete dias.

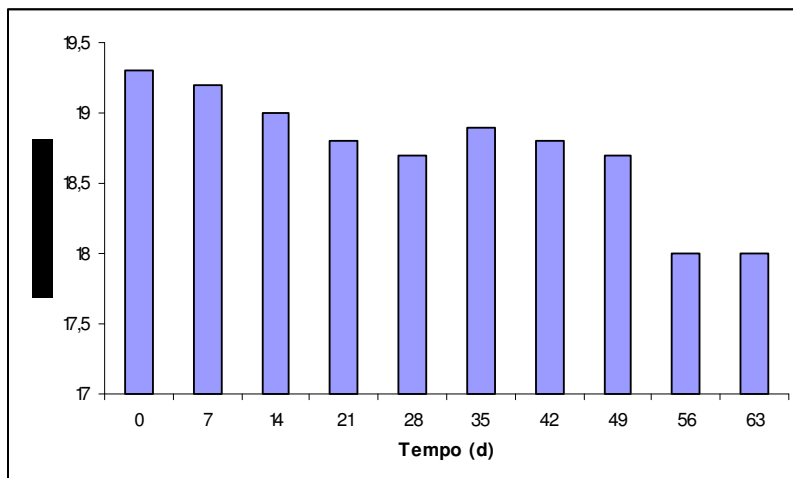


Figura 4.26. Estabilidade do extrato enzimático (obtido da fermentação utilizando microrganismo imobilizado) armazenado em congelador (-10°C).

Estabilidade do extrato enzimático em temperatura de geladeira

A Figura 4.27 apresenta os resultados encontrados para o extrato bruto armazenado à temperatura de geladeira (4°C), para o mesmo intervalo de tempo de armazenamento.

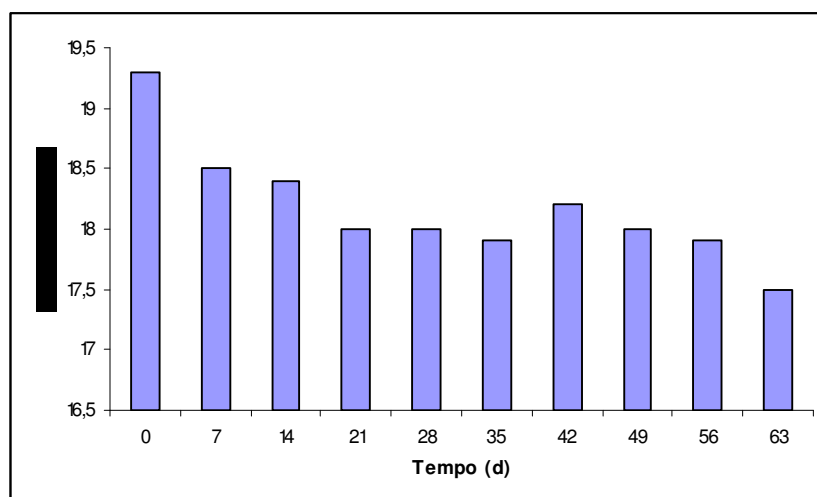


Figura 4.27. Estabilidade do extrato enzimático (obtido da fermentação utilizando microrganismo imobilizado) armazenado em geladeira (4°C).

Analisando as Figuras 4.26 e 4.27, pode-se observar que os dois extratos não diminuíram significativamente sua atividade lipásica durante o tempo de armazenamento.

Observa-se, portanto, que os dois extratos apresentaram um comportamento variável em relação à manutenção da sua atividade durante o armazenamento.

A Tabela 4.14 apresenta a compilação dos resultados referentes à caracterização parcial dos extratos enzimáticos brutos produzidos através do microrganismo livre e imobilizado.

Tabela 4.14 Dados da caracterização parcial dos extratos enzimáticos brutos produzidos através do microrganismo livre e imobilizado.

Parâmetro	<i>Penicillium</i> sp. livre	<i>Penicillium</i> sp. imobilizado
Temperatura ótima	32 – 42°C	42 – 44°C
pH ótimo	4,8 – 5,5	5,5 – 7,0
T° de estabilidade	25 – 35°C	25 – 35°C
pH de estabilidade	4,8 – 5,5	4,8 – 6,5
Estabilidade a 4°C	134 dias	63 dias
Estabilidade a -10°C	134 dias	63 dias
t ½ 25°C	462 min	144 min
t ½ 35°C	365 min	105 min
t ½ 45°C	120 min	94 min
t ½ 55°C	17 min	86 min
t ½ 65°C	16 min	64 min

4.4 Considerações finais

O estudo comparativo da produção de lipase por FS utilizando *Penicillium* sp. livre e imobilizado mostrou ser um processo interessante, pois além de ter sido realizado com um microrganismo isolado no próprio laboratório, o microrganismo imobilizado apresentou atividade maior que a obtida com o microrganismo livre. Além deste fato, cumpre mencionar as vantagens de se utilizar microrganismo

suportado, pelo interesse em reuso e maior resistência aos processos de produção. Cabe salientar a lacuna encontrada na literatura referente ao processo de produção de lipases utilizando microrganismos imobilizados.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1. CONCLUSÕES

Após a realização deste estudo pode-se concluir que:

- A máxima atividade lipásica obtida por fermentação submersa utilizando *Penicillium* sp. livre foi 9,5U/mL em 96 horas de fermentação a 28°C, sendo o meio sintético constituído de 2%(m/v) de peptona, 0,5%(m/v) de extrato de levedura e 1% (m/v) de óleo de oliva.
- A caracterização parcial do extrato bruto enzimático produzido por FS e *Penicillium* sp. livre apresentou condições ótimas de atividade a 42°C em pH 5,5 e manteve sua estabilidade entre 25 e 35°C e valores de pH entre 5,5 e 6,5.
- Em relação ao estudo da estabilidade a baixas temperaturas concluiu-se que o extrato enzimático obtido utilizando *Penicillium* sp. livre pode ser armazenado em temperatura de congelamento (-10°C) por até 160 dias sem perder sua atividade lipásica, e em temperatura de geladeira (4°C) sem que ocorra diminuição de sua atividade até 134 dias de armazenamento.
- A produção de lipase por FS em meio sintético utilizando *Penicillium* sp. imobilizado em gel de alginato de sódio apresentou atividade lipásica máxima de 20,96U/mL em 120 horas de fermentação, sendo que o meio sintético utilizado foi o mesmo otimizado na fermentação utilizando o microrganismo livre.
- O microrganismo imobilizado proporcionou atividade lipásica praticamente 100% maior em comparação à obtida utilizando *Penicillium* sp. livre.
- Quanto ao estudo da caracterização parcial do extrato enzimático obtido da fermentação utilizando *Penicillium* sp. imobilizado foi obtida maior atividade lipásica a 37°C e pH 7, e o extrato manteve sua estabilidade entre 25 e 35°C e pH 5,5.

- O microrganismo utilizado foi isolado no Laboratório da URI –Campus de Erechim e apresentou resultados satisfatórios para produção de lipase.
- Através da análise de superfície de resposta foi possível obter condições ótimas para a produção de lipase em FS utilizando *Penicillium* sp. livre e imobilizado.

5.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho sugere-se como trabalhos futuros:

- Otimização da produção de lipases utilizando o microrganismo livre;
- Teste de imobilização do microrganismo com outros suportes;
- Estudo da produção de lipase imobilizando o micélio;
- Estudo do número de ciclos com as células imobilizadas, tanto em frascos agitados quanto em fermentador;
- Avaliação cinética de atividade lipásica em menores intervalos de tempo de fermentação, utilizando o microrganismo livre e imobilizado;
- Avaliação da produção de lipases pelo microrganismo livre e imobilizado utilizando resíduos agro-industriais como substratos;
- Purificação e imobilização dos extratos enzimáticos brutos obtidos utilizando microrganismo livre e imobilizado;
- Aplicações do extrato enzimático obtido através do *Penicillium* sp. 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.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Enhancement of lipase production during repeted batch culture using immobilised *Candida rugosa*. *Process Biochemistry*, vol. 32, p. 437-440, 1997.

BURKERT, J.F. de M. Otimização das Condições de Produção da Lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552. Campinas: 2002. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

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

CAMARGO, E. F. B.; SANTOS, M. A. B.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; ANTUNES, A. C. Bioconversão de β – Pineno a α - Terpinol utilizando *A. niger* ATCC 16404 livre e imobilizado. CD-ROM. XII Encontro Regional de Engenharia de Alimentos – EREAL, Erechim, RS, 2006.

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

COSTA, V. E. U., AMORIM, H. L.N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. *Química Nova*, vol 22, p. 6, 1999.

DRAGET, K. I.; SKJAK-BRAEK, G. SMIDSROD, O. Alginate based new materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, Norway, vol. 21, p. 47-55, 1997.

ELIBOL, M., OZER, D. Lipase production by immobilised *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*, Turkey, vol. 36, pag. 219-223, 2000.

ELLAIAH, P., PRABHAKAR, TT. , RAMAKRISHNA, B., THAER TALEB, A., ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, India, vol.39, p. 525-528, 2004.

FADILLOGLU, S.; e SOYLEMEZ, Z. Kinetics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil. *Food Research International*, v. 30, p. 171-175, 1997.

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

FICKERS, P.; ONGENA, M.; DESTAIN, J.; WEEKERS, F.; THONART, P.; Production and down-stream processing an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Enzyme and Microbial Technology*, vol 38, p. 756-759, 2006.

FREIRE, D.M.; GOMES, P.M.; BON, E.P.S.; LIPPEL SAN'T ANNA Jr., G.L. Lipase production by a new promissing strain *Penicillium restrictum*. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.28, n.1, p.6-12, 1997.

FREIRE, M. G. D.; CASTILHO, R. L. Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido. *Rev. Bras. Farm.*,Rio de Janeiro,v.81, p.48-56, 1999.

GANDHI, N. N. Applications of lipase. JAOCS, v. 74, p. 621-634, 1997.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and Microbial Technology, in press, 2005.

HEMACHANDER, C., BOSE, N. PUVANAKRISHNAN, R. Whole cell immobilization of *Ralstonia pickettii* for lipase production. Process Biochemistry, India, vol.36, p. 629-633, 2001.

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

KEMPKA, A. P., PINHEIRO, T. D. L.F., LIPKE, N. L., MENONCIN, S., TREICHEL, H., FREIRE, D. M. G., DI LUCCIO, M., OLIVEIRA, D.D. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solide-state fermentation. Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 31, p. 119-125, 2008.

KOLOSSVÁRY, G. J. Optimization of lipase activity from *Rhizopus* sp. in trigliceride hydrolysis using a modified simplex method. Process Biochemistry, v. 31, p. 595-600, 1996.

LEAL, M. C. M. R., FREIRE, D. M. G., CAMMAROTA, M. C.; SANT'ANNA Jr., G. L. Estudo das condições de produção de lipases pelo fungo *Penicillium restrictum* utilizando planejamento experimental. CD-Rom. Simpósio Internacional de Fermentações – SINAFERM, Florianópolis, SC, 2003.

LI, C-Y., CHENG, C-Y., CHEN, T-L. Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase using Tween 80 as the carbon source. Vol. 29, p. 258-263, 2001.

LIMA V. M. G. et al.: Production of Lipase by *Penicillium aurantiogriseum*, Food Technol. Biotechnol. Brasil, Curitiba, Vol. 41 (2), pag. 105–110, 2003.

LIMA, V.M.G., (2004). Produção e purificação da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 e sua aplicação em biocatálise em solventes orgânicos. Tese de Doutorado em Ciência (Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

LIU, C-H., LU, W-B., CHANG, J-S. Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. by response surface methodology. Process Biochemistry, vol. 41, p. 1940-1944, 2006.

MAHADIK, N.D.; BASTAWDE, K. B.; PUNTAMBEKAR, U. S.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation. Process Biochemistry, vol. 39, p. 2031-2034, 2004.

MALDONADO, Rafael Resende. Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais. Campinas: 2006. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Campinas, Faculdade de engenharia de alimentos.

MARIANO, G. Q.; DALTON, H.. Biotransformation of aromatic compounds by immobilized bacterial strains in bariun alginate beads. Enzyme and Microbial Technology, New York, vol 24, p. 232-236, 1999.

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.

OLIVEIRA D. D. S., CARDOSO V. L. Hidrólise da lactose do soro de queijo utilizando a enzima b-galactosidase. Uberlândia. Projeto de Pesquisa. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia.

ORIVE, G.; PONCE, R. M.; HERNÁNDEZ, A.R.; GASCÓN, M.; PEDRAZ, I. J. L.. Biocompatibility of microcapsules for cells immobilization elaborated with different type of alginates. Biomaterials, vol. 23, p. 3825-3831, 2002.

PALEKAR, A. A.; VASUDIVAN, P. T.; YAN, S. Purification of Lipase: a Review. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 18, nº 3, p. 177-2000, 2000.

PASTORE, M. G.; COSTA, V.S.R.; KOBLITZ, M.G.B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.23, n.2, p.0101-106, 2003.

PEINADO, A. R.; MORENO, J. J.; VILLABA, M. J.; GONZÁLEZ-REYES, J. A. Yeast biocapsules: Anew immobilization method and their applications. *Enzyme and Microbial Technology*, Córdoba, vol 40, p. 79-84, 2006.

PETROVIC,S.E. ; SKRINJAR, M. ; VUJICIC, I. F. ; BANKA, L. Effect of various carbon sources on microbial biosynthesis. *Biotechnology Letters*, London, v. 12, n.4, p.299-304, 1990.

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.

QI, W-T.; MA, J.; YU, W-T.; XIE, Y-B.; WANG, W.; MA, X. Behavior of microbial growth and metabolism in alginate-chitosan-alginate (ACA) microcapsuls. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, vol. 38, p. 697-704, 2006.

ROCHA, W. S., GROSSO, C. R. F. Permeação de solutos de diferentes massas moleculares em matrizes compostas de alginato de cálcio e acetofitalato de Celulose. *Sitentibus*, Feira de Santana, n.35, p.125-148, 2006

SABUQUILLO, P.; REINA, J.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Interfacial affinity chromatography of lipases: Separation of different fractions by seletive adsorption on supports actived with hydrophobic groups. *Biochimica and Biophysica Acta*, Amsterdam, v.1388, p.337-348,1998.

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

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

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

SZTAJER, H.; LUNSDORF, H.; ERDMANN, H.; MENGE, U.; SCHIMID, R. Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. *Biochimica and Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1124, n.3, p.253-261, 1992.

TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Process Biochemistry*, vol. 39, p. 459-465, 2003.

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.

WANG, N. S.; Cells immobilization with calcium alginate. Home Page, Biochemical Engineering Laboratory, www.eng.umd.edu/~nSw/ench485/lab11.htm, em 29/11/2007.

WOOLEY, P. e PETERSON, S. B. Lipases their structure production *Biochemistry and application*. Cap 12. Cambridge University Press, 1994.

YANG, X., WANG, B.; CUI, F.; TAN, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*, vol. 40, p. 2095-2103, 2005.

ZNIDARSIC, P., PAVKO, A., The Morphology of Filamentous Fungi in Submerged Cultivations as a Bioprocess Parameter. Food Technology and Biotechnology, Ljubljana, Slovenia, Vol. 39, p. 237-252, 2001.