



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

ELISANDRA RIGO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LIPASES
COM ATIVIDADE DE HIDRÓLISE E DE SÍNTESE POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE FARELO DE SOJA**

**Florianópolis - SC
2009**

ELISANDRA RIGO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LIPASES
COM ATIVIDADE DE HIDRÓLISE E DE SÍNTESE POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE FARELO DE SOJA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Co-Orientador:

Prof. Dr. Marco Di Luccio

**Florianópolis – SC
2009**

R565p Rigo, Elisandra.

Produção e caracterização parcial de lipases com atividade de hidrólise e de síntese por fermentação em estado sólido de farelo de soja. Elisandra Rigo – Florianópolis, 2009.

188f.; il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina.
Centro Tecnológico. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos.

1. Lípase, 2. Seleção. 3. *Penicillium*. 4. Fermentação em estado sólido. 5. Farelo de soja. 6. Hidrólise e esterificação. I. Título.

ELISANDRA RIGO

**TRATAMENTO AVANÇADO DE EFLUENTES DE
FRIGORÍFICO DE AVES E O REÚSO DA ÁGUA**

Tese julgada para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos, área de Concentração de Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, ____de _____ de 2009.

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow
Orientador

Prof. Dr. Marco Di Luccio
Co-Orientador

Profa. Dra. Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz
Coordenadora do CPGEA

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Débora de Oliveira

Profa. Dra. Susana Juliano Kalil

Profa. Dra. Márcia Brandão Palma

Profa. Dra. Regina Vasconcellos Antônio

“Esta conquista dedico a minha família, ao Iloir, e aos meus amigos, pelo companheirismo, carinho e ensinamentos”

AGRADECIMENTOS

A todas as forças do universo...

Ao Programa de Pós-graduação em da Universidade Federal de Santa Catarina por possibilitar a consolidação de uma aspiração, o Doutorado em Engenharia de Alimentos.

À Universidade Regional Integrada Campus de Erechim pela estrutura onde desenvolvemos a pesquisa, bem como ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos e todo seu corpo docente pela oportunidade de minha inserção em um dos projetos de pesquisa do programa. Às incansáveis funcionárias e amigas, Aline e Karine pela dedicação, bem como, todos da instituição que de alguma forma contribuíram para a pesquisa.

À empresa Intecnial pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa que resultou na construção da tese.

Aos meus orientadores, pela oportunidade do uso incondicional, de suas imagens profissionais, exemplo para minha formação técnica e humana, dedico a consolidação de nosso projeto.

Professor Jorge Ninow por acreditar e aceitar o desafio de orientação à distância.

Professor Marco Di Luccio pelo companheirismo e incansável dedicação na construção de meus conhecimentos.

Agradeço a oportunidade de convivência, considerando que através desta tive a honra de partilhar momentos com o profissional de conduta exemplar que és, chefe instigador e acolhedor, orientador incansável perante situações de dúvidas, crises, dilemas e imaturidade, sempre prezando pela construção das minhas opiniões e conceitos.

Às professoras Eunice Valduga e Helen Treichel por aceitarem minha presença em seu espaço de trabalho e assim, pela amizade, atenção e conselhos nos momentos das maiores crises existenciais, profissionais. Ainda, gostaria de ressaltar a importante e indispensável colaboração da professora Helen por compartilhar seu conhecimento no auxílio para o tratamento estatístico dos dados experimentais da tese.

À professora Débora de Oliveira, “minha madrinha de Doutorado” pela confiança e comprometimento para angariar oportunidades a minha pessoa, junto aos demais colegas. Também pela dedicação e colaboração com seus conhecimentos para consolidação de minha tese. À dupla “Submit” Helen e Débora pelo apoio e ensinamentos sobre a importância de um “paper” na vida profissional de um pesquisador.

Aos amigos, palavra que uso como indicador de pessoas muito especiais, com as quais divido minhas conquistas, angústias e dilemas sobre os caminhos que devo percorrer e conquistar tentando ser uma pessoa íntegra, de princípios imbuíveis...

- Primeiramente ao Iloir, meu companheiro, amigo, exemplo de integridade, profissionalismo obrigado por compartilhar todos os momentos incansavelmente ao meu lado.
- Minha mãe Luiza Rigo (Bidi), meu exemplo de mulher de doação. Ao meu pai, Arthur Rigo por amparar meus projetos. E aos dois algo não menos importante, mas um fato determinante para este momento, a oportunidade de trazer-me ao mundo.
- Minha irmã Sandra e seu esposo Roberto Rotta por integrar nossa família e por compartilhar as exuberantes estrelinhas chegadas do céu, Sara e Gabriela Rigo Rotta, pelo incentivo, coragem e sentido de vida.
- Alice Valduga (Tia Alice) pela amizade fraterna e incansáveis ensinamentos obrigado por brilhar minha vida, por amparar meus passos nos caminhos de pedras que tive de percorrer.
- Gean Delise Vargas, obrigado pelo apoio e dedicação como minha família quando eu estava distante desta conquista você é parte fundamental.
- Clarissa Dalla Rosa (Clari), minha irmã do coração, não tenho palavras que expressem seu significado para mim.
- Losiane Paviani Diel, amiga incansável, obrigado pela dedicação e sinceridade durante todos os anos de convivência, pelo apoio e referência familiar enquanto estive em Campinas, SP.
- Luciana Venquiaruto e Rogério Dallago obrigado pelo carinho, amparo e oportunidades de convivência e conquistas.
- Jarbas Ferrari, Gisele Javornik (Gi), Roberta Krüger (Ro), Elton Franceschi (Lino), pela paciência e compreensão que somente amigos conseguem.
- Aos amigos que mesmo distantes participaram incondicionalmente deste projeto, através das lembranças que carrego em meu coração. Ao Marcelo Lanza, Marcelo Grings, Jean Brustolin, Elizandra Piva, a família Moretto.

Aos queridos bolsistas de iniciação científica pela paciência e incansável colaboração para o desenvolvimento de nossa pesquisa. Gostaria de expressar toda minha gratidão e orgulho de ter feito parte desta equipe. Assim, dedico a forma material de todo nosso esforço conjunto, esta tese é conquista de todos nós.

- Às primeiras colaboradoras e companheiras, inicialmente voluntárias Daniela Remonato, Peke (“Querida chefe, tenho que estudar”. “Não aguento mais as contaminações”) e Renata Vardanega, Re (“ Ô eu estava pensando”), que com muito orgulho conquistaram seu espaço e as bolsas de iniciação científica e que hoje, reconheço como eficientes e íntegras colegas.
- À bolsista Francieli Arbter, FranFran, pelo companheirismo, competência, e serenidade em todos os momentos dedicados a nossa pesquisa e a mim, como pessoa sendo exemplo de compreensão e doação. “Se tiver que ser feito, então vamos fazer”
- Ao bolsista André Polloni, Polonho, nosso fiel companheiro pela dedicação, alegria, otimismo e curiosidade investigativa. “Vai dar tudo certo”, “Sem mistério”
- Agradeço às bolsistas voluntárias que também integraram nossa equipe, Melânia Sychoski pela dedicação e carinho, bem como, a Eline Rosset pela contribuição nas atividades do trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da URI – Erechim.

- Nara Griebeler pela participação incondicional como amiga e companheira nas atividades experimentais.
- Silvana Menoncin, pelo apoio companheirismo e dedicação aos trabalhos experimentais.
- Às professoras e colegas Jô Ceni e Geciane Toniazzo, bem como aos colegas Lindomar Lerin, Morgana P. Maloz, Ieda Rotava e Márcio Mazutti pela paciência, colaboração e amizade.

Ao professor Cláudio Zarkzevski pelo apoio na manutenção das condições estruturais para a realização das atividades experimentais.

Ao professor Rogério Cansian pela colaboração com seus conhecimentos no desenvolvimento da etapa de isolamento e estocagem de microrganismos.

À Coordenadora do Curso de Nutrição URI, Erechim Profa. Roseana Spinelli, pelo amparo e oportunidades.

Ao prof. Francisco Maugeri e a profa Maria Isabel Rodrigues do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB) da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, SP pela acolhida e dedicação ao PROCAD, bem como a Dra. Fátima A.A. Costa pela contribuição e atenção incondicional durante todo tempo que estive no LEB.

“Devemos compreender sem ilusão o que realmente somos, e não o que pensamos ser, e com coragem, realizar nossa transformação. Ser agora, o presente. O futuro é uma consequência vivida no presente e não fruto de uma mente ociosa, que deixa sempre esta transformação para depois. É nossa obrigação passar de necessitado a útil”.

Vera Lúcia Marinzeck de Carvalho

RESUMO

Este trabalho buscou isolar e selecionar novos microrganismos capazes de produzir lipases com atividade de hidrólise e de esterificação, e avaliar a produção e a caracterização de lipases extracelulares por fermentação em estado sólido (FES) em farelo de soja com os microrganismos selecionados. Observou-se que dentre os microrganismos isolados, os fungos filamentosos do gênero *Penicillium* apresentaram os melhores resultados como produtores de lipase com atividade hidrolítica. Por outro lado as cepas de leveduras foram as que apresentaram melhor desempenho na catálise da reação de produção de n-propil oleato, sendo somente duas cepas fúngicas selecionadas entre os 17 microrganismos hábeis para produção de lipase com atividade de esterificação. A fermentação em estado sólido para produção de lipase com atividade hidrolítica usando farelo de soja apresentou resultados promissores. O estudo da suplementação revelou o *Penicillium* 58F como o mais eficiente para produção de lipase hidrolítica, nos distintos valores de pH avaliados, sendo a suplementação com uréia acrescida de óleo de soja a que resultou nas melhores atividades. A técnica de planejamento de experimentos mostrou-se eficiente para maximização do processo fermentativo para produção de lipase hidrolítica. O processo foi maximizado com suplementação de 0,60% de uréia acrescida de óleo de soja para atingir relação de C/N 6,11, umidade 75%, granulometria farelo de soja de 1-2 mm, concentração de inóculo de 2×10^8 esporos/g e 20 °C. A atividade hidrolítica máxima obtida em meio ácido foi de 200 U/g farelo de soja seco após 120h de fermentação, em pH neutro de 317 U/g e em alcalino obteve-se atividade de 191 U/g farelo de soja seco, ambos em 96 h fermentação. Os resultados demonstram haver produção de altas concentrações de lipase extracelular, possivelmente um pool de lipases, com potencial hidrolítico em uma ampla faixa de pH. A relação C/N de 6,11 foi a que resultou nas melhores produtividades. A condição otimizada para extração da lipase foi usando tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0 e temperatura de 25°C, 150 rpm, e razão sólido/líquido de 1:4, com incubação de 15 minutos. A caracterização parcial do extrato enzimático hidrolítico bruto e pré-purificado apresentou temperatura ótima de atividade de 37°C, para ambas, e pH ótimo igual a 7 e na faixa de 9 a 10, respectivamente. A maior estabilidade dos extratos bruto e pré-purificados foi a 25 °C e pH 7. A exposição a CaCl_2 levou à inativação do extrato enzimático hidrolítico pré-purificado. A especificidade do extrato enzimático hidrolítico pré-purificado indicou atividades em ésteres com uma faixa de comprimento de cadeia variando de C4 a C18.

Palavras-chave: Lipase, seleção, *Penicillium*, fermentação em estado sólido, farelo de soja, hidrólise e esterificação.

ABSTRACT

This work aimed to isolating and selecting new lipase-producing microorganisms, able to produce lipase both with synthesis and hydrolysis activities, and to assess the production and characterization of extracellular lipases, by solid state fermentation (SSF) using soybean meal as substrate, with the microorganisms isolated in the previous step. The filamentous fungi of the genera *Penicillium* presented the best production results in terms of hydrolytic activity. The best performance on production of lipases with synthesis activity (n-propyl oleate) was obtained with the yeast strains, while only two fungal strains produced lipases with a good potential for synthesis among the 17 selected strains. The use of soybean meal as substrate for SSF presented promising results. The study on the supplementation of this substrate showed that the *Penicillium* sp. 58F was the most potential lipase producer, considering three different pH values. The use of urea and soybean oil resulted in the highest lipase activities. The lipase production could be optimized using the experimental design technique. Maximum activity was obtained using soybean meal (75% moisture and particle size 1-2 mm) supplemented with 0.6% urea and soybean oil to reach a C/N ratio of 6.11, 2×10^8 spores/g and 20 °C. The resulting activity in acid medium was 200 U/g of dry substrate after 120 h of fermentation. In neutral and alkaline medium maximum activities were 317 U/g and 191 U/g after 96 h of fermentation, respectively. The results suggest that a pool of lipases is produced, with a high lipolytic activity in a wide pH range. The C/N ratio 6.11 maximized the lipase production. The optimum extraction condition was phosphate buffer (pH 7.0 100 mM), 25°C, 150 rpm, solid to liquid ratio 1:4 and incubation for 15 min. Partial characterization of the crude and pre-purified extract showed that both presented optimum temperature for activity of 37°C and optimum pH of 7 and 9-10, respectively. The crude and pre-purified extract were more stable at 25°C and pH 7.0. The exposure of the extract to CaCl_2 induced to a inactivation of the pre-purified extract. The specificity of the pre-purified extract showed that good activities could be obtained in long chain p-nitro esters and triacylglycerols.

Keywords: Lipase, screening, *Penicillium*, solid state fermentation, soybean meal, hydrolysis, esterification.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 3: Material e Métodos

- Figura 3.1** - Béqueres utilizados para a FES. 64
Figura 3.2 - Esquema demonstrativo da técnica de microcultivo para fungos filamentosos. 65

CAPÍTULO 4: Resultados

- Figura 4.1** - Exemplo de um halo de hidrólise em meio sólido contendo tributirina. 81
Figura 4.2 - Evolução do halo produzido pela hidrólise da tributirina de produtores de lipase isolados de amostras de solo (a), de produtos lácteos (b) e amostras diversas (c). 82
Figura 4.3 - Aparência do farelo de soja antes (a) e após (b) a fermentação..... 84
Figura 4.4 - Avaliação da atividade de hidrólise do óleo de oliva por diferentes lipases produzidas em fermentação em estado sólido por microrganismos isolados de solo e amostras diversas (a), de amostras de farelo de soja (b) e de amostras de produtos lácteos (c). 85
Figura 4.5 - Aspecto microscópico das estruturas de frutificação de *Aspergillus* (a) e de *Penicillium* (b). 88
Figura 4.6 - Efeito dos álcoois, metanol, etanol, *n*-propanol e *n*-butanol na reação de esterificação do ácido oléico catalisada por lipases brutas produzidas pelos microrganismos que se destacaram dentre os selecionados como produtores de lipase com atividade de esterificação..... 96
Figura 4.7 - Atividades de esterificação obtidas com o uso de lipases brutas produzidas pelos microrganismos que se destacaram dentre os selecionados como produtores de lipase com atividade de esterificação, em ácido oléico e láurico, com *n*-propanol..... 100
Figura 4.8 - Cinética da produção de lipase pelo *Penicillium* 58F determinadas em pH 4,0 (a), pH 7,0 (b) e pH 9,0 (c), em farelo de soja suplementado com óleo de soja (OS), melão (ME), água de maceração de milho (AMM),

- hidrolisado de levedura (HL), farelo de soja (FP), uréia (UR) e uréia acrescida de óleo de soja (UROS). 108
- Figura 4.9** - Cinética da produção de lipase pelo *Penicillium* 74F determinadas em pH 4,0 (a), pH 7,0 (b) e pH 9,0 (c), em farelo de soja suplementado com óleo de soja (OS), melaço (ME), água de maceração de milho (AMM), hidrolisado de levedura (HL), farelo de soja (FP), uréia (UR) e uréia acrescida de óleo de soja (UROS). 111
- Figura 4.10** - Avaliação cinética da produção de protease do *Penicillium* 58F (a) e 74F (b) em farelo de soja suplementado com óleo de soja (OS), melaço (ME), água de maceração de milho (AMM), hidrolisado de levedura (HL), farelo de soja (FP), uréia (UR) e uréia acrescida de óleo de soja (UROS). 113
- Figura 4.11** - Cinética de produção de lipase para cada condição estudada no primeiro planejamento experimental (PB12), temperatura (°C), umidade (%), granulometria (Tyler), concentração de esporos (esporos/g) e do suplemento (uréia acrescida de óleo de soja, UROS %), na produção de lipase hidrolítica com *Penicillium* F58 em fermentação com farelo de soja. 115
- Figura 4.12** - Produtividade da enzima hidrolítica dos ensaios 7 (símbolos preenchidos), 11 (símbolos abertos), e Central (símbolos preenchidos em cinza), do planejamento experimental Plackett-Burman (Tabela 4.14), sendo as dosagem da atividade em pH 4(), pH7(O), e pH9 (Δ). 121
- Figura 4.13** - Aspecto do meio de fermentação com *Penicillium* 58F para produção de lipase hidrolítica com farelo de soja na granulometria entre 1 e 2 mm - ensaio 7 (a) e 0,25 e 0,50 mm - ensaio 11 (b). 122
- Figura 4.14** - Produtividade da enzima hidrolítica obtida através do processo fermentativo do farelo de soja com *Penicillium* 58F a 20°C e 27°C. Demais variáveis nas condições dos ensaios 7 do planejamento experimental Plackett-Burman, □ pH 4, ○ pH 7, Δ pH 9. 127
- Figura 4.15** - Cinética de produção de lipases hidrolíticas com atividade em (a) pH 4, (b) pH 7 (c) pH 9 nas condições experimentais do segundo planejamento. 130
- Figura 4.16** - Superfícies de resposta das atividades hidrolíticas determinadas em pH 4 (a) e a pH 7 (b), obtidas em função

	da umidade (%), e suplementação (uréia acrescida de óleo de soja, UROS %), do farelo de soja, após 96 h de fermentação.....	132
Figura 4.17	- Cinética de produção de lipases hidrolíticas com atividade em (a) pH 4, (b) pH 7 (c) pH 9 nas condições experimentais do terceiro planejamento.	134
Figura 4.18	- Superfícies de respostas das atividades hidrolíticas determinadas em pH 7 (a) em 96 h fermentação e (b) 120 h fermentação, obtidas em função da umidade (%), e suplementação (uréia acrescida de óleo de soja, UROS %), do farelo de soja.....	137
Figura 4.19	- Superfície de resposta da atividade hidrolítica determinada em pH 9 e 96 h fermentação, obtidas em função da umidade (%), e suplementação (uréia acrescida de óleo de soja, UROS %), do farelo de soja.....	139
Figura 4.20	- Cinética de produção de protease nas condições do planejamento experimental PB12 pelo <i>Penicillium</i> 58F, em farelo de soja.....	144
Figura 4.21	- Superfície de resposta da atividade hidrolítica obtida mostrando a interação da temperatura e pH.....	148
Figura 4.22	- Superfície de resposta da atividade hidrolítica obtida mostrando a interação do pH e razão sólido-líquido.....	149
Figura 4.23	- Cinética de extração da enzima do farelo fermentado..	151
Figura 4.24	- Efeito do pH na atividade hidrolítica da lipase pré-purificada produzida por FES com <i>Penicillium</i> 58F.....	156
Figura 4.25	- Efeito da temperatura na atividade hidrolítica da lipase pré-purificada produzida por FES com <i>Penicillium</i> 58F.	157
Figura 4.26	- Avaliação da atividade hidrolítica do extrato enzimático pré-purificado seco, em diferentes triglicerídeos.....	165
Figura 4. 27	- Avaliação da atividade hidrolítica de diferentes ésteres de <i>p</i> nitrofenol.....	166

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2: Revisão Bibliográfica

- Tabela 2.1** - Exemplos de aplicações industriais de lipases 34
- Tabela 2.2** - Descrição de alguns substratos naturais e microrganismos envolvidos na fermentação em estado sólido para produção de lipases com atividade de hidrólise..... 43
- Tabela 2.3** - Descrição de temperaturas e pH ótimos para lipases brutas e purificadas produzidas em diferentes sistemas de fermentação e culturas microbianas..... 51
- Tabela 2.4** - Descrição de temperaturas e pH de estabilidade para lipases brutas e purificadas produzidas em diferentes sistemas de fermentação e culturas microbianas. 52

CAPÍTULO 3: Material e Métodos

- Tabela 3.1** - Faixa dos fatores investigados no primeiro planejamento experimental PB12 (Plackett-Burman) 72
- Tabela 3.2** - Faixa dos fatores investigados no segundo planejamento experimental 72
- Tabela 3.3** - Faixa dos fatores investigados no terceiro planejamento experimental 72
- Tabela 3.4** - Avaliação da produção de lipase com atividade hidrolítica em farelo de soja suplementado com uréia acrescida a óleo de soja em diferentes relações C/N..... 73
- Tabela 3.5** - Faixa das variáveis investigadas no planejamento completo 2^4 para avaliação do processo de extração da enzima contida na matriz sólida. 74

CAPÍTULO 4: Resultados

- Tabela 4.1** - Avaliação comparativa entre os fungos selecionados como produtores de lipase com maior atividade hidrolítica em farelo de soja aos fungos em placa com indicador tributirina. 87

Tabela 4.2 - Descrição das atividades hidrolíticas e classificação quanto ao gênero dos microrganismos produtores de lipases selecionados.	89
Tabela 4.3 - Atividades de esterificação do ácido oléico e <i>n</i> -propanol, e de hidrólise do óleo de oliva dos microrganismos selecionados.	92
Tabela 4.4 - Descrição das atividades de esterificação do ácido oléico com os alcoóis, metanol, etanol, <i>n</i> -propanol e <i>n</i> -butanol.	94
Tabela 4.5 - Especificidade das lipases produzidas em FES com as 17 cepas selecionadas, considerando a atividade de esterificação destes, frente ao ácido oléico e láurico com <i>n</i> -propanol.	99
Tabela 4.6 - Caracterização do farelo de soja e dos suplementos utilizados na fermentação em estado sólido.	102
Tabela 4.7 - Comportamento da suplementação do farelo de soja na produção de lipases por FES com <i>Penicillium</i> 58F, avaliadas através da atividade hidrolítica em óleo de oliva em pH 7.	104
Tabela 4.8 - Características dos suplementos adicionadas para produção de lipase hidrolítica em fermentação em estado sólido (FES) com farelo de soja.	105
Tabela 4.9 - Evolução do pH nos diferentes meios de fermentação utilizados para produção de lipase no decorrer do processo fermentativo com <i>Penicillium</i> 58F.	106
Tabela 4.10 - Evolução dos valores de pH nos diferentes meio de fermentação utilizados para produção de lipase no decorrer do processo fermentativo com <i>Penicillium</i> 74F.	106
Tabela 4.11 - Cinética da atividade hidrolítica de lipase produzida com <i>Penicillium</i> 58F em farelo de soja suplementado com uréia acrescida de óleo de soja (UROS) em diferentes pH.	109
Tabela 4.12 - Comparação entre as atividades hidrolíticas obtidas através da fermentação com farelo de soja suplementado com uréia acrescida de óleo de soja nos tempos de máxima produtividade com os microrganismos selecionados.	110
Tabela 4.13 - Estudo da influência do volume de inóculo em 96 e 120 h de fermentação com <i>Penicillium</i> 58F para produção de	

	lipase hidrolítica em farelo de soja suplementado com 5,5% (p/p) de uréia e óleo de soja.....	114
Tabela 4.14	- (a). Matriz do planejamento experimental Plackett-Burman com valores reais e codificados das variáveis manipuladas e as respectivas respostas em termos de atividade hidrolítica em 96 h de fermentação, e diferentes pH de medida de atividade.	117
Tabela 4.15	- (a) Efeito das variáveis de processo, estudadas no planejamento experimental (PB12), na produção da lipase hidrolítica após 96 e 120 h de fermentação, determinadas em pH 4.	119
Tabela 4. 16	- Efeito da variação da temperatura de fermentação (20°C e 27°C) na atividade hidrolítica.	128
Tabela 4.17	- Matriz do segundo planejamento experimental com valores reais e codificados das variáveis, resposta em termos de atividade hidrolítica após 96 h de fermentação.	131
Tabela 4.18	- Análise de variância para a atividade hidrolítica determinada em pH4.....	131
Tabela 4.19	- Análise de variância para a atividade hidrolítica determinada em pH7.....	133
Tabela 4.20	- Matriz do terceiro planejamento experimental completo com 11 ensaios, com as respostas da atividade lipásica nos pH 4, 7 e 9.	135
Tabela 4.21	- Efeito das variáveis de processo, estudadas no terceiro planejamento experimental, na produção da lipase hidrolítica após 96 e 120h de fermentação, determinadas em pH 4.	135
Tabela 4.22	- Análise de variância para a atividade hidrolítica determinada em pH 7 após 96 h de fermentação.	136
Tabela 4.23	- Análise de variância para a atividade hidrolítica determinada em pH 7 após 120 h de fermentação.	136
Tabela 4.24	- Análise de variância para a atividade hidrolítica determinada em pH 9 após 96 h de fermentação.....	138
Tabela 4.25	- Acompanhamento da maximização da produção da lipase hidrolítica em farelo de soja e <i>Penicillium</i> 58F em 96 e 120 h de fermentação.....	140
Tabela 4. 26	- Razão de carbono e nitrogênio no meio de fermentação para produção de lipase hidrolítica em 96 e 120 h de fermentação com <i>Penicillium</i> 58F.....	142

Tabela 4.27 - Matriz do planejamento experimental 2 ⁴ com os valores reais e codificados com as respostas em termos de atividade hidrolítica (após 15 minutos de extração)....	147
Tabela 4.28 - Análise de variância para extração da lipase com atividade hidrolítica.....	148
Tabela 4.29 - Acompanhamento do comportamento do extrato enzimático hidrolítico durante as etapas de pré-purificação.....	153
Tabela 4.30 - Efeito do pH na atividade do extrato enzimático bruto produzido por <i>Penicillium</i> 58F.....	154
Tabela 4.31 - Efeito da temperatura na atividade do extrato enzimático bruto produzido por <i>Penicillium</i> 58F.....	155
Tabela 4.32 - Influência do pH na estabilidade do extrato enzimático bruto obtido em por FES com <i>Penicillium</i> 58F.....	159
Tabela 4.33 - Influência da temperatura na estabilidade do extrato enzimático bruto obtido em sistema de FES com <i>Penicillium</i> 58F.....	159
Tabela 4.34 - Avaliação da influência do pH na estabilidade do extrato enzimático pré-purificado.....	161
Tabela 4.35 - Avaliação da influência da temperatura na estabilidade do extrato enzimático concentrado.....	162
Tabela 4.36 - Influência dos sais de CaCl ₂ na atividade da lipase pré-purificada.....	163

PUBLICAÇÕES

Parte deste trabalho foi publicada/apresentada nos seguintes periódicos/eventos

Artigos Publicados

Griebeler, N., Polloni, A.E., Remonato, D., Arbter, F., Vardanega, R., Cechet, J. L., Di Luccio, M., Oliveira, D., Treichel, H., Cansian, R. L., Rigo, E., Ninow, J. L. (2009). Isolation and *screening* of lipase-producing fungi with hydrolytic activity, *Food and Bioprocess Technology*. DOI 10.1007/s11947-008-0176-5

Wolski, E., Menusi, E., Remonato, D., Vardanega, R., Arbter, F., Rigo, E., Ninow, J. L., Mazutti, M.A., Di Luccio M., Oliveira, D., Treichel, H. (2009). Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid state and submerged fermentation: a comparative study, *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1557-1560.

Rigo, E., Ninow, J.L., Di Luccio, M., Polloni, A.E., Remonato, D., Arbter, F., Vardanega, R., Rostirola Jr, D., Oliveira, D., Treichel, H., (2009). Improved lipase biosynthesis by a newly isolated *Penicillium* sp., *Industrial Biotechnology*, 5, 119-126.

Vardanega, R., Remonato, D., Arbter, F., Polloni, A., Rigo, E., Ninow, J.L., Treichel, H., Oliveira, D., Di Luccio, M. (2009). A systematic study on extraction of lipase obtained by solid state fermentation of soybean meal by a newly isolated strain of *Penicillium* sp., *Food and Bioprocess Technology*. DOI 101007/s11947-009-0224-9.

Artigos Enviados para Publicação

Rigo, E., Ninow, J.L., Di Luccio, M., Remonato, D., Polloni, A.E., Arbter, F., Vardanega, R., Oliveira, D., Treichel, H., Menoncin, S., Kalil, S.J., Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases produced by solid state fermentation. Em revisão *Food Chemistry*

Rigo, E., Ninow, J.L., Di Luccio, M., Remonato, D., Polloni, A.E., Arbter, F., Vardanega, R., Sychoski, M., Oliveira, D., Treichel, H. Kinetic behavior of lipase production by solid-state fermentation of soybean bran with different supplements. Em revisão Food Science and Technology (LWT).

Artigos apresentados em Eventos

Rigo, E., Ninow, J.L., Di Luccio, M., Remonato, D., Polloni, A.E., Arbter, F., Vardanega, R., Oliveira, D., Treichel, H., Menoncin, S., Kalil, S.J., Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases produced by solid state fermentation. Trabalho enviado ao XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal, RN, Agosto de 2009.

Rigo, E., Vardanega, R., Remonato, D., Arbter, F., Ninow, J., Treichel, H., Oliveira, D., Sychoski, M., Luccio, M. Caracterização parcial de lipase de *Penicillium sp.* produzida por fermentação em estado sólido. Trabalho completo em Anais em CD-ROM do V Simpósio de Alimentos para a Região Sul, Passo Fundo, RS, 2007.

Rigo, E., Ninow, J. L., Menoncin, S., Griebler, N., Treichel, H., Oliveira, D., Di Luccio, M. Estudo da Extração de Lipase Obtida por Fermentação em Estado Sólido em Farelo de Soja. Trabalho completo em Anais em CD-ROM do IX ERSCTA - IX Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Curitiba, PR 2007.

SUMÁRIO

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO	29
-------------------------	-----------

CAPITULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	32
2.1 Lipases	32
2.2 Aplicações de lipases	33
2.3 Produção de lipases	35
2.3.1 Microrganismos	36
2.3.2 Fermentação em estado sólido	38
2.3.3 Suplementação do meio sólido	41
2.3.4 Variáveis do processo de fermentação em estado sólido	44
2.4 Purificação de extratos enzimáticos	47
2.5 Características bioquímicas	49
2.5.1 Avaliação de temperatura e pH	50
2.5.2 Especificidade ao substrato	53

CAPITULO 3

MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1 Materiais	57
3.2 Equipamentos	58
3.3 Métodos	58
3.3.1 Isolamento e seleção de microrganismos	60
3.3.2 Identificação dos microrganismos	65
3.3.3 Determinação da atividade hidrolítica	66
3.3.4 Determinação da atividade de esterificação	67
3.3.5 Atividade proteásica	68
3.3.6 Determinação de proteína	69
3.3.7 Estudo da suplementação do farelo de soja	69
3.3.8 Estudo da produção de lipase hidrolítica	71
3.3.9 Caracterização parcial da lipase hidrolítica	73
3.3.10 Caracterização parcial da lipase com atividade de esterificação	77
3.3.11 Composição físico-química do farelo de soja	77

CAPITULO 4

RESULTADOS	80
4.1 Isolamento de microrganismos produtores de lipases.....	80
4.2 Seleção de microrganismos produtores de lipases com atividade hidrolítica	80
4.2.1 Seleção de fungos em meio sólido	80
4.2.2 Seleção por fermentação em estado sólido	83
4.2.3 Identificação dos Fungos Filamentos Seleccionados.....	87
4.3 Seleção de microrganismos produtores de lipases com atividade de esterificação	90
4.3.1 Seleção por fermentação em meio sólido.....	90
4.3.2 Caracterização parcial da lipase bruta com atividade de esterificação	93
4.4 Estudo da produção de lipase hidrolítica	101
4.4.1 Avaliação da suplementação do meio de fermentação.....	101
4.4.2 Maximização da produção da lipase hidrolítica.....	113
4.5 Caracterização parcial das lipases produzidas em fes utilizando <i>Penicillium 58f</i>	146
4.5.1. Estudo da extração da enzima.....	146
4.5.2 Pré-purificação do Extrato Enzimático	152
4.5.3 Determinação da Temperatura e pH Ótimos.....	154
4.5.4 Avaliação da Estabilidade do Extrato Hidrolítico Bruto.....	158
4.5.5 Avaliação estabilidade do extrato hidrolítico pré-purificado	160

CAPITULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	167
5.1 Conclusões	167
5.2. Sugestões para trabalhos futuros.....	168

REFERÊNCIAS.....	170
-------------------------	------------

ANEXOS.....	186
Anexo I - Solução de azocaseína 0,5%	186
Anexo II - pH ótimo do extrato pré-purificado	187
Anexo III - pH ótimo do extrato pré-purificado.....	188

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO

A biotecnologia consiste hoje em um dos campos mais promissores de tecnologias mundiais de ponta, sendo a tecnologia enzimática de grande destaque. Os altos custos de enzimas purificadas disponíveis comercialmente incentivam pesquisas nesta área. Mais de 4.000 enzimas são conhecidas, muitas delas utilizadas comercialmente, sendo a maioria delas de origem microbiana.

Fazendo parte do grupo das hidrolases, destacam-se as lipases (E.C. 3.1.1.3) devido o seu poder catalítico na modificação de lipídios esterificados, via hidrólise, esterificação e interesterificação, bem como na obtenção de ácidos graxos específicos ou glicerídeos de óleos vegetais (Kumar et al., 2005; Bradoo et al., 2002). As lipases efetuam reações de hidrólise de triacilgliceróis a ácidos graxos, mono e diacilgliceróis e gliceróis, na interface óleo-água da reação. Esta enzima possui também habilidade de catalisar reações em meios orgânicos, favorecida pelos baixos conteúdos de água presente nas reações (Ruiz et al., 2008; Chowdary e Prapulla, 2002).

O uso destes biocatalisadores específicos em processos industriais de alimentos, detergentes, cosméticos, síntese orgânica, farmacêutica e tratamento de efluentes gordurosos, vêm ganhando espaço, devido à sua versatilidade de aplicação.

Diversas técnicas de produção de lipases têm sido desenvolvidas e aprimoradas, ampliando as possibilidades de aplicações industriais. Instituído-se assim em um importante tema de estudo, devido ao volume de vendas, movimentando milhões de dólares.

A exploração da biodiversidade biológica, incluindo bactérias, fungos e leveduras na busca de microrganismos hábeis a produzir lipases consiste em uma boa perspectiva para área científica e comercial.

Dependendo do microrganismo usado na fermentação e do tipo de fermentação, a lipase obtida apresenta diferentes especificidades. As inúmeras variáveis que envolvem o processo de obtenção da enzima vão desde a composição do meio até a definição das condições operacionais do processo fermentativo, tornando-se essencial a definição das condições que maximizem a produção das lipases.

Para isso a fermentação em estado sólido (FES) tem se mostrado como uma alternativa importante na produção de enzimas microbianas. Apresentando grande vantagem na produção de lipases para uso em reações de esterificação. Considerando que em algumas aplicações é

possível dispensar os processos de extração, purificação e imobilização da enzima, utilizando-se diretamente a matriz sólida fermentada (Ruiz et al., 2008; Fernandes et al., 2007; Nagy et al., 2006).

O uso de subprodutos agroindustriais como substrato na produção de lipases, além de agregar valor a materiais de baixo custo no mercado, pode vir a reduzir o preço final da enzima (Rodríguez et al., 2006; Soccol & Vandenberghe, 2003; Pandey, 2003; Castilho et al., 2000). Neste contexto, a aplicação de tortas residuais do processo de extração de óleos vegetais, de soja, coco, gergelim e oliva, como fonte de nutrientes e matriz de suporte para vários processos biotecnológicos torna-se uma potencial alternativa. A possibilidade de utilização de um dos subprodutos da cadeia de produção do biodiesel, o farelo de soja, para produção de lipase tem crescido no Brasil pelo fato de agregar valor ao resíduo agroindustrial.

Neste sentido, é de grande importância a efetivação de estudos sistemáticos sobre condições apropriadas de produção de lipase, a partir de microrganismos isolados e pré-selecionados, bem como, na obtenção de meios de baixo custo.

A caracterização dos biocatalisadores produzidos com a determinação dos parâmetros tanto do extrato enzimático bruto como do pré-purificado possibilita a indicação de enzimas nativas em processos catalíticos industriais.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral selecionar microrganismos para avaliar a produção de lipases com atividade de hidrólise e de esterificação e avaliar a produção e caracterização de lipases extracelulares por fermentação em estado sólido com uso de farelo de soja com microrganismos previamente selecionados, seguido do estudo das características do extrato enzimático produzido.

Dentre os objetivos específicos, destacam-se as principais etapas da pesquisa para produção de lipases através da fermentação em estado sólido (FES) em farelo de soja com os microrganismos selecionados:

- Isolamento e seleção de microrganismos produtores de lipase com atividade hidrolítica e de esterificação;
- Avaliação da especificidade das lipase com atividade de síntese em relação a alcoóis e ácidos graxos;
- Estudo da produção de lipase hidrolítica por fermentação em estado sólido;
- Avaliação da pré-purificação de lipase hidrolítica;
- Determinação da estabilidade da lipase hidrolítica em função da temperatura e pH.

A descrição do presente estudo foi realizada em capítulos, sendo que o Capítulo 2 apresenta a revisão bibliográfica efetuada para dar fundamentação teórica a todas as etapas deste estudo. No Capítulo 3 descrevem-se os materiais, as técnicas e os equipamentos utilizados nas diferentes etapas do trabalho. No Capítulo 4 apresentam-se os resultados investigados, subdivididos em subcapítulos:

No primeiro são apresentados os resultados de isolamento de microrganismos. No segundo, os resultados e discussão da etapa de seleção dos microrganismos com atividade hidrolítica e de esterificação são descritos. Na sequência, a avaliação da especificidade das lipases com atividade de esterificação em relação a álcoois e ácidos graxos é apresentada. O estudo da produção de lipase com atividade de hidrólise é então apresentado, seguido da caracterização do extrato bruto e purificado, produzido pelo fungo *Penicillium* sp. F58, e avaliação da especificidade da lipase hidrolítica em diferentes triglicerídeos e ésteres de *p*-nitrofenol.

No Capítulo 5 apresentam-se as conclusões obtidas após a realização dos experimentos e discussão dos resultados e, finalmente, as sugestões para trabalhos futuros relacionados à produção de lipases microbianas.

CAPITULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A maioria das enzimas são moléculas de proteínas complexas que agem como catalisadores em reações bioquímicas. Elas são formadas por células de todos os seres vivos. Estes catalisadores biológicos são extremamente eficientes e muito específicos nas suas funções, desta forma, o uso de enzimas para novas aplicações industriais vem crescendo muito nos últimos tempos, vindo de encontro ao apelo da diminuição a agredões ambientais.

Enzimas lipolíticas, como lipases e esterases, constituem um importante grupo de enzimas associadas com o metabolismo de degradação de lípidios. Os microrganismos produtores de lipase podem ser encontrados no solo e em diversos resíduos oleosos. Os aspectos biológicos, fisiológicos e de aplicação industrial das lipases vêm sendo bastante estudados devido à sua ação sobre substratos insolúveis em água.

Este capítulo tem por finalidade apresentar o estado da arte sobre a aplicação industrial de lipases, estratégias de seleção de microrganismos para produção de lipases através de fermentação em estado sólido (FES), bem como sobre os processos de purificação, empregados na fase de recuperação (*downstream*) da enzima obtida.

2.1 Lipases

As lipases (E.C.3.1.1.3) são glicerol éster hidrolases capazes de hidrolisar triacilgliceróis (principais componentes de óleos e gorduras) liberando ácidos graxos livres, glicerol, mono e diacilgliceróis, atuando na interface óleo-água, onde ocorre um aumento da atividade da enzima através do mecanismo de ativação interfacial. Essas enzimas também catalisam reações de esterificação e transesterificação quando presentes em meio não aquoso (Saxena et al, 2003a, Shimada et al., 2002; Pandey et al., 1999; Jaeger e Reetz, 1998).

O processo de transesterificação, também chamado de alcoólise, consiste no deslocamento do álcool e de um éster. Alguns álcoois são empregados de modo satisfatório na reação, dentre estes pode-se citar, o metanol, etanol, propanol e o butanol, sendo que o mais amplamente utilizado é o metanol devido ao baixo custo e às vantagens físicas e

químicas deste reagente (Fukuda et al., 2001).

Nas lipases, o sítio ativo fica localizado dentro de uma cavidade hidrofóbica que pode ser superficial ou profunda, de acordo com a homologia a que pertencem. Nesta cavidade se aloja o ácido graxo de modo a posicionar a ligação éster alinhada com o sítio ativo. Esta cavidade é geralmente protegida por uma “tampa” polipeptídica que se abre, expondo o sítio ativo, quando a lipase se encontra na interface polar/apolar. Isto explica porque a grande maioria das lipases tem sua atividade aumentada sobre substratos insolúveis em água na interface óleo/água (Derewenda, 1994).

Assim, as lipases tornam-se biocatalisadores de muita importância em diferentes áreas, devido à possibilidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito. A capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, a sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos, e a sua quimio-regio e enantioselectividade, são algumas peculiaridades deste tipo de enzima (Contesini e Carvalho, 2006; Saxena et al, 2003a; Pandey et al, 1999; Jaeger e Reetz, 1998).

2.2 Aplicações de lipases

As aplicações industriais das lipases envolvem os setores de alimentos, química fina, tratamento de resíduos, couro, cosméticos, farmacêutico, médico, ainda para produção de biodiesel e novos materiais poliméricos (Kumar et al., 2005; Burkert et al., 2004; Pandey et al., 1999). Diversas técnicas têm sido desenvolvidas e aprimoradas para a obtenção de maiores rendimentos de produção, além de enzimas mais robustas e altamente específicas para cada tipo de aplicação, ampliando as possibilidades de aplicações industriais destes biocatalisadores (Soccol e Vandenberghe, 2003).

As lipases são usadas como biocatalisadores versáteis na química orgânica moderna, especialmente na modificação de gorduras e outros lípidios via hidrólise, esterificação e interesterificação, como na obtenção de ácidos graxos específicos ou glicerídeos de óleos vegetais. A seletividade da lipase ao substrato é uma propriedade determinante na aplicação. Assim, a caracterização da enzima em relação à seletividade de seu substrato como diferentes triglicerídeos, metil ésteres e óleos e gorduras, torna-se fundamental para aplicação destes biocatalisadores (Kumar et al., 2005; Bradoo et al., 2002).

As lipases são utilizadas em diversos campos de aplicação,

devido às suas características biocatalíticas. A Tabela 2.1 sintetiza as principais aplicações das lipases em diferentes segmentos (Martins et al., 2008; Hasan et al., 2006; Jaeger e Eggert, 2002; Villeneuve et al., 2000), considerando as reações de hidrólise e a esterificação.

Tabela 2.1 - Exemplos de aplicações industriais de lipases

<i>Indústria</i>	<i>Aplicações</i>	<i>Produtos</i>
Hidrólise		
Alimentos	Hidrólise da gordura do leite	Desenvolvimento de “flavour” lácteos
	Hidrólise de óleos e gorduras	Ácidos graxos, mono diglicerídeos;
Química	Biorremediação	Reagentes para análise de gordura
	Tratamento efluente gorduroso	Biossurfactantes
Química (detergentes)	Análise de ácidos graxos de TGC	Redução sólidos
	Remoção de manchas de gorduras	Detergentes (roupas e superfícies)
Médica	Análise de triglicérides do sangue	Kits de diagnóstico
Farmacêutica, agroquímica	Hidrólise <i>estéreo-específica</i>	Resolução misturas racêmicas
Esterificação		
Química (química fina)	Síntese de ésteres	Compostos quirais intermediários: terapêutico; Ésteres e emulsificantes; “Flavour”, Fragrância para cosméticos; Agroquímicos, herbicidas.
Alimentos, Química, Farmacêutica	Transesterificação (óleos naturais)	Óleos e gorduras: análogos de manteiga de cacau, Biodiesel
Têxtil	Síntese de poliésteres	Poliésteres biodegradáveis, aromáticos, fibras sintéticas.
Alimentos	Síntese de ésteres	Aromas para alimentos e bebidas

2.3 Produção de lipases

Lipases podem ser produzidas por uma grande quantidade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras. Muitos autores reportam os procedimentos de isolamento, purificação de lipases e a influência da composição do meio de cultura na produção da enzima. Em particular, a incorporação de diferentes substâncias lipídicas pode resultar na produção de diferentes isoenzimas (Zarevúcka et al., 2005; Saxena et al., 2003b). Na busca da elevação dos níveis de produção da enzima, técnicas de clonagem e expressão de genes envolvidos na produção de lipases podem ser empregadas buscando lipases específica para aplicações de interesse comercial (Burkert et al., 2004).

Lipases e esterases são, pela classificação geral, éster carboxílico hidrolases (EC 3.1.1). Ambas as enzimas catalisam a hidrólise e a síntese de ligações éster (Kim et al., 2007). São diferenciadas pela composição de seus substratos (Chahinian et al., 2005). As esterases hidrolisam éster com ácidos carboxílicos de cadeia curta, enquanto lipases preferem acilglicerídeos de cadeia longa (Kim et al., 2007). A atividade hidrolítica nem sempre pode ser correlacionada com a atividade de síntese de uma lipase. Sendo assim, o método para *screening* de lipase com atividade de síntese deve ser diferenciado (Sandoval & Marty, 2007; Cardenas et al., 2001).

O *screening* de microrganismos com atividade lipolítica pode facilitar a descoberta de novas lipases. Enzimas termoestáveis são, em particular, bastante atrativas para aplicações industriais, devido à manutenção de sua atividade a altas temperaturas e estabilidade em solventes orgânicos. Pesquisas reportam algumas lipases termoestáveis produzidas por *Bacillus* sp., *B. coagulans* e *B. circulans* (Kumar et al., 2005).

As lipases microbianas são importantes para o desenvolvimento biotecnológico quando aplicadas como catalisadores para reações de hidrólise e síntese de acilgliceróis e ácidos graxos. O crescente potencial de aplicações das enzimas microbianas se deve à variabilidade das estruturas da proteína obtida. Lipases provenientes de fontes microbianas distintas apresentando uma ampla faixa de propriedades dependentes da fonte produtora, relacionadas com a especificidade posicional, especificidade ao substrato, termoestabilidade, pH ótimo entre outros. A temperatura de estabilidade é uma característica mais relevantes para aplicação industrial dos biocatalisadores (Treichel et al., 2009), assim os microrganismos adaptados, por exemplo, a baixas temperaturas, apresentam potencial produtivo para lipases psicrófilas.

Lipases psicrófilas normalmente possuem grande flexibilidade de sua estrutura, o que permite sua aplicação em sistemas com baixo conteúdo de água, comportamento diferente pode ser apresentado pelas enzimas mesófilas ou termófilas, devido à rigidez de suas propriedades catalíticas (Joseph et al., 2008).

Assim, enzimas microbianas são usualmente mais úteis quando comparadas às de origem animal ou vegetal, devido à sua especificidade na atividade catalítica, possibilitando altos rendimentos. Deve-se considerar ainda a possibilidade de manipulação genética, a ausência do efeito da sazonalidade, rápido desenvolvimento da cultura e ainda a possibilidade de aplicação de meios pouco onerosos, tornam as enzimas microbianas convenientes biocatalisadores para aplicações industriais diversas (Hasan et al., 2006).

2.3.1 Microrganismos

Muitos microrganismos apresentam capacidade para produzir lipases extracelulares. Vários métodos podem ser usados para seleção de microrganismos através da determinação da presença de lipase extracelular. Dentre estas, inclui-se a utilização de meio sólido com presença de substratos indutores como óleos vegetais, triglicerídeos padrão (tributirina, trioleína, etc), Tween 80, e corantes que possibilitam a visualização da reação de hidrólise (Damaso et al., 2008; Ko et al., 2005; Cardenas et al., 2001; Wang et al., 1995). No entanto, alguns destes substratos podem não ser adequados para detecção de lipases, tornando-se de importante a verificação da especificidade de hidrólise ou síntese por lipases e esterases (Kouker e Jaeger, 1987). Alguns autores citam o uso de Rodamina B o qual resulta na produção de um complexo fluorescente pela produção de lipases nas placas, facilitando a visualização das colônias produtoras de enzima (Wang et al., 1995; Kouker e Jaeger, 1987), e corante azul de bromofenol (Damaso et al., 2008).

Muitos microrganismos são reportados como produtores de lipases, entre eles pode-se citar *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina*, *Burkholderia cepacia* (Jaeger e Reetz, 1998). Pesquisas ainda relatam sobre *Geotrichum* sp. (Burkert et al., 2004), *Geotrichum candidum* DBM 4013 (Zarevúcka et al., 2005), *Pseudomonas cepacia*, *Bacillus stearothermophilus*, *Burkholderia cepacia* (Bradoo et al., 2002), *Candida lipolytica* (Tan et al., 2003), *Bacillus coagulans* (Alkan et al.,

2007), *Bacillus coagulans* BTS-3 (Kumar et al., 2005), *Pseudomonas aeruginosa* PseA (Mahanta et al., 2008) e *Clostridium thermocellum* 27405 (Chinn et al., 2008), *Yarrowia lipolytica* (Dominguez et al., 2003) e *Yarrowia lipolytica* CL180 (Kim et al., 2007).

No caso específico da produção de lipase via FES, muitas pesquisas são realizadas utilizando culturas fúngicas para fermentação, como *Penicillium restrictum* (Azeredo et al., 2007; Palma et al., 2000; Castilho et al., 2000; Gombert et al., 1999), *Penicillium simplicissimum* (Vargas et al., 2008; Gutarra et al., 2007; 2005; Cavalcanti et al., 2005; Di Luccio et al., 2004), *Penicillium verrucosum* (Kempka et al., 2008), *Penicillium* sp. (Wolski et al., 2009a; 2009b), *Aspergillus oryzae* (Rahardjo et al., 2005), *Rhizopus oligosporus* (Ul-Haq et al., 2002), *Rhizopus homothallicus* (Diaz et al., 2006; Rodriguez et al., 2006), *Rhizopus rhizopodiformis* (Cordova et al., 1998), *Aspergillus niger* MTCC 2594 (Mala et al., 2007).

Em muitos trabalhos se faz o uso de tributirina e óleo de oliva para isolamento e seleção de microrganismos lipolíticos em placas de Petri contendo meio sólido e o substrato, acompanhando-se o desenvolvimento do halo hidrolítico. Por exemplo, Cardenas et al. (2001) selecionaram *Fusarium oxysporum* e *Ovadendron sulphureo-ochraceum*, *Fusarium solani*, *Rhodotorula araucariae*, *Penicillium chrysogenum*, *Arthroderma ciferrii*, *Achremonium murorum*, como produtores de lipases aplicáveis para biocatálise na síntese de compostos orgânicos. Também foram investigados como suplementos indicadores o óleo de girassol e Tween 80, usados em meios para seleção de bactérias e fungos (Ko et al., 2005).

Os fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Rhizomucor*, *Aspergillus*, *Candida* e *Penicillium* têm sido indicados como produtores de algumas das lipases comerciais. A demanda industrial de novas fontes de lipases com diferentes características enzimáticas e de baixo custo, estimula o isolamento e seleção de novos microrganismos lipolíticos. O processo de produção pode alterar a expressão do gene, variar o fenótipo tal como crescimento, produção de metabólitos secundários e enzimas. Assim, após a seleção primária é importante a avaliação da produção da enzima durante o crescimento da cepa promissora na fermentação, em meio líquido (FS) e/ou em estado sólido (FES) (Colen et al., 2006). Contudo, é claro que cada sistema resultará em diferentes proteínas, com características específicas quanto à catálise de reações, e consequentemente dos produtos formados (Asther et al., 2002).

2.3.2 Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido (FES) é definida como a fermentação envolvendo sólidos em ausência ou quase ausência de água livre, sendo que o substrato deve possuir umidade suficiente para proporcionar o desenvolvimento do metabolismo dos microrganismos. O desenvolvimento deste sistema envolve aspectos de Engenharia Bioquímica, incluindo a cinética, modelagem matemática, *design* de biorreatores e sistemas de controle avançado (Couto e Sanromán, 2005; Holker e Lenz, 2005; Pandey, 2003).

A tendência atual da FES está focalizada no desenvolvimento de bioprocessos que possam ser aplicados na biorremediação e biodegradação de compostos perigosos, desintoxicação biológica de resíduos agro-industriais, biotransformação de culturas e resíduo de culturas para enriquecimento nutricional, biopolpas e produção de produtos com maior valor agregado como metabólitos secundários, biológicos ativos, entre estes os antibióticos, enzimas, ácidos orgânicos, aromas, biocombustíveis, etc. (Couto e Sanromán, 2005; Pandey, 2003; Raghavara et al., 2003; Pandey et al., 2000).

A FES é um sistema promissor, principalmente sob alguns aspectos, como o fato de apresentar baixa demanda de água e energia, respondendo aos apelos ecológicos, produzindo menor quantidade de água residuária, menor custo de operação e investimento inicial por ser uma tecnologia relativamente simples (Rodriguez et al., 2006; Couto e Sanromán, 2005; Holker e Lenz, 2005; Holker et al., 2004; Pandey, 2003; Raghavarao et al., 2003).

A fermentação em estado sólido (FES) tem se mostrado como uma alternativa na produção de enzimas microbianas, devido à possibilidade de utilização de resíduos e subprodutos da agroindústria como fonte de nutrientes e suporte para o desenvolvimento do microrganismo. A utilização de subprodutos agroindustriais como substrato na produção de lipases, além de agregar valor a materiais de baixo custo no mercado, pode vir a reduzir o preço final da enzima (Rodriguez et al., 2006; Socol & Vandenberghe, 2003; Pandey, 2003; Castilho et al., 2000).

As tortas residuais de processos de extração de óleos são bastante usadas na indústria de alimentos para animais, por possuírem boas quantidades de proteína. Muitos estudos têm avaliado o uso das tortas de oleaginosas em bioprocessos. Aplicação biotecnológica de torta de girassol, soja, coco, mostarda, palma, algodão, canola, oliva entre outras, podem ser utilizadas para obtenção de enzimas, antibióticos,

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

O número de estudos envolvendo fungos associados a diferentes matrizes sólidas, para produção de lipases hidrolíticas tem crescido nos últimos anos, destacando-se, o *Penicillium restrictum* (Azeredo et al., 2007; Palma et al., 2000; Castilho et al., 2000; Gombert et al., 1999) e *Penicillium simplicissimum* (Gutarra et al., 2007; 2005; Cavalcanti et al., 2005) cultivado em torta de babaçu, bem como o crescimento do *Penicillium simplicissimum* (Vargas et al., 2008; Di Luccio et al., 2004) e *Penicillium verrucosum* (Kempka et al., 2008), *Penicillium* sp. (Wolski et al., 2009b) em farelo de soja e no caso do *Aspergillus oryzae* em resíduos de trigo (Rahardjo et al., 2005). Ainda deve-se ressaltar o uso de *Rhizopus oligosporus* em farelo de trigo (Ul-Haq et al., 2002), bem como *Rhizopus homothallicus* em bagaço de cana de açúcar (Diaz et al., 2006; Rodriguez et al., 2006).

O uso conjugado de farelo de trigo e torta de gergelim, previamente descritos como potenciais substratos sólidos por (Mahadik et al., 2002; Kamini et al., 1998) respectivamente para produção de lipase, foram avaliados por Mala et al. (2007), utilizando a cepa de *Aspergillus niger* MTCC 2594 com os respectivos substratos (3:1) resultando em um aumento de 36% de atividade. O inóculo de *Rhizopus rhizopodiformis* em bagaço de cana de açúcar acrescido de torta de óleo de oliva (1:1) proporcionou acréscimo de 30% da atividade enzimática quando comparada ao uso do bagaço de cana (Cordova et al., 1998). Cabe ainda ressaltar a pesquisa, envolvendo o uso da fermentação em estado sólido para produção de lipase através de culturas bacterianas como *Bacillus coagulans* em resíduos sólidos de vegetais (Alkan et al., 2007), *Pseudomonas aeruginosa* PseA em torta de pinhão manso (Mahanta et al., 2008) e *Clostridium thermocellum* 27405 (Chinn et al., 2008) e da levedura *Yarrowia lipolytica* em farelo de cevada (Dominguez et al., 2003).

A produção de lipase por fermentação em estado sólido com diferentes substratos sólidos combinados com uma grande variedade de fungos tem sido reportada em trabalhos da literatura, bem como as vantagens desta frente à fermentação submersa devido à possibilidade do uso de substratos naturais de baixo custo (Holker et al., 2004; Castilho et al., 2000). A produção de lipase de *Penicillium restrictum* utilizando FES e resíduo da indústria de óleo de babaçu é relatada em pesquisas como uma técnica promissora para obtenção da enzima

(Azeredo et al., 2007; Palma et al., 2000; Castilho et al., 2000; Gombert et al., 1999) bem como de *Penicillium restrictum* e *Penicillium simplicissimum* (Gutarra et al., 2007; 2005; Cavalcanti et al., 2005).

A utilização do farelo de soja como suplemento-suporte para a FES é ressaltada em pesquisas usando o fungo *Penicillium simplicissimum* (Vargas et al., 2008; Di Luccio et al., 2004) e *Penicillium verrucosum* (Kempka et al., 2008), *Penicillium sp.* (Wolski et al., 2009b) como também em bagaço de cana de açúcar com *Rhizopus homothallicus* (Diaz et al., 2006; Rodriguez et al., 2006), *Rhizopus rhizopodiformis* (Cordova et al., 1998). Recentemente, pesquisas avaliaram o uso de resíduos sólidos de vegetais como suplementos para compor a matriz sólida da FES (Alkan et al., 2007), bem como, a torta de pinhão manso (Mahanta et al., 2008) e farelo de cevada (Chinn et al., 2008; Dominguez et al., 2003).

A comparação econômica da produção de lipase por *Penicillium restrictum* em fermentação em estado sólido (FES) e submersa (FS) foi realizada por Castilho et al. (2000). A FES foi relatada como economicamente atrativa, sendo necessário um investimento 78% menor comparado ao necessário para à FS. Essa diferença se deve também pela diferença dos substratos: para FES a torta de babaçu suplementada com óleo de oliva frente ao meio com peptona de carne, extrato de levedura e óleo de oliva para FS. Assim, a diferença do potencial produtivo de lipases microbianas em sistemas FES e FS, estão possivelmente relacionadas principalmente a conformação e composição do meio, das culturas selecionadas e das variáveis operacionais de cada sistema, sendo em pequena escala a FES apresenta bons resultados em termos de produtividade do processo, conforme descrito por Treichel et al. (2009).

Lipases produzidas com o fungo *Penicillium sp.* foram avaliadas através estudo comparativo da fermentação submersa (FS) e em estado sólido (FES). Os resultados confirmaram que a FES apresenta maior potencial produtivo, bem como uma enzima mais estável a 25°C em comparação ao sistema FS (Wolski et al., 2009b). A otimização da produção de lipases com *Rhizopus homothallicus* revelou a limitação que cada sistema apresentou frente aos suplementos utilizados. Verificou-se a obtenção de enzimas com atividades de 8600U/g com FS e 10700U/g com FES em temperaturas de produção de 30 e 40°C respectivamente (Diaz et al., 2006).

A avaliação do comportamento do crescimento de fungos através da estimação de valores da taxa de crescimento específico e níveis de biomassa em sistemas de FS e FES revelou as vantagens da produção de enzimas em fermentação estado sólido quando comparado ao sistema

submerso (González et al., 2003). Azeredo et al. (2007) verificaram diferenças fisiológicas entre os sistemas de FES e FS, após a adição de fontes simples (ácido oléico e glicose) e complexas (óleo de oliva e amido) de carbono para crescimento do *Penicillium restrictum* e produção de lipase. A adição de glicose ocasionou efeito negativo na produção de lipase por FS, comportamento não observado no caso da FES, a não repressão observada no caso da matriz sólida pode estar vinculada a diversidade da composição encontrada na FES em comparação ao sistema líquido resultando em enzimas mais robustas.

Nagy et al. (2006) avaliaram a viabilidade da aplicação do material sólido fermentado por *Mucor hiemalis*, diretamente em reações de síntese. O preparado sólido demonstrou ser efetivo em reações seletivas de biotransformações. Da mesma forma, a adição direta de sólidos da FES para catalisar reações em meio orgânico, na produção de etil oleato e na transesterificação do óleo de milho com etanol foi investigada, ressaltando as vantagens do uso da enzima imobilizada no suporte natural da fermentação com *Burkholderia cepacia* em farelo de milho (Fernandes et al., 2007).

Luo et al. (2006) reportam a capacidade de catálise de reações de transesterificação para produção de biodiesel com lipase produzida em meio líquido a 20°C com *Pseudomonas fluorescens* selecionada de amostra de solo. A produção de lipase por *Rhizopus chinensis* em mistura de farelo de girassol e farelo de trigo (3:2) foi avaliada, demonstrando potencial biocatalítico para síntese de ésteres aromáticos. A atividade máxima de síntese 24,0 U/g de substrato foi obtida após 72 horas de fermentação em meio suplementado com peptona e óleo de oliva e 70% umidade, resultando em aumento de 15 vezes a atividade obtida quando comparada ao meio inicial (Sun e Xu, 2008). Pesquisas revelam o uso dos fungos filamentosos, *Rhizopus* sp. e *Aspergillus niger* na FES para produção de catalisadores para reação de síntese do etil oleato (Ruiz et al., 2008) e butil oleato (Dutra et al., 2008), respectivamente.

2.3.3 Suplementação do meio sólido

Lipídios são geralmente indutores essenciais para uma alta produção de lipase. Na produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*, em condições específicas e diferentes materiais lipídicos, a atividade máxima obtida pode chegar a 69,0 U/g quando se utilizaram castanhas trituradas, um substrato com alto teor de óleo (Dominguez et al., 2003).

A relação C/N é um fator que pode alterar a produção de lipases,

conforme mostrado por Gombert et al. (1999), que estudaram a produção de lipase por *Penicillium restrictum* em torta de babaçu suplementada com peptona e óleo de oliva. As maiores atividades foram obtidas em meio com óleo de oliva (30,3 U/g) e peptona (27,8 U/g) em 24 horas. Os resultados indicaram que o tipo da fonte de suplemento influencia mais que a taxa de C/N na produção, possivelmente devido ao conteúdo de aminoácidos e co-fatores necessários para biosíntese da lipase (Palma et al., 2000).

Resultados semelhantes (26,4 U/g) foram obtidos suplementando-se a mesma torta de babaçu com melão de cana de açúcar, em biorreator de leito fixo (Cavalcanti et al., 2005; Gutarra et al., 2005). A fermentação em torta de soja por *Penicillium simplicissimum* sem suplementação do meio pode render até 21,0 U/g de lipase (Di Luccio et al., 2004) sendo 30,0 U/g após otimização das condições de produção a 27,5°C (Vargas et al., 2008).

O babaçu de cana de açúcar foi o substrato usado na pesquisa para produção de lipase termoestável por FES por *Rhizopus homothallicus*. A pesquisa revelou que o uso de uréia bem como, dos óleos vegetais avaliados, foram eficientes suplementos para produção de lipase através da FES, sendo o óleo de oliva, uréia e micronutrientes a composição do meio selecionado que resultou em atividade hidrolítica de 826,0 U/g (Rodriguez et al., 2006). Comportamento contrário foi verificado com a cultura de *Aspergillus niger* MTCC 2594 em torta de gergelim suplementado com uréia (5% m/m), extrato de carne e peptona, glicose e sacarose e alguns óleos vegetais não foram eficientes para aumento da produção da lipase, quando comparados ao ensaio controle (363,0 U/g) (Kamini et al., 1998).

A comparação das lipases extracelulares produzidas pelo fungo termotolerante *Rhizopus homothallicus* em FES e FS foi realizada por Diaz et al. (2006). A atividade enzimática específica obtida com trioleína foi significativamente maior para FES. O babaçu de cana foi usado como matriz e suplementado com óleo de oliva, lactose, uréia e sais com 75% de umidade a 40°C em colunas de Raimboul, utilizadas na FES com fungos termoestáveis *Rhizopus rhizopodiformis* e *Rhizomucor pusillus*. Em ambos os casos, a suplementação com óleo de oliva foi promissora, resultando em atividades de 79,6 U/g e 20,2 U/g, respectivamente (Cordova et al., 1998).

Na FES o microrganismo não cresce somente na superfície do material sólido, mas também penetra nos espaços inter e intracelulares do suporte estabelecendo contato ou associação com este. Por esta razão

é que os resíduos agro-industriais são empregados não somente como suporte da fermentação, mas também como fonte de nutrientes para o microrganismo (Dominguez et al., 2003). Um resumo dos principais trabalhos sobre produção de lipase com atividade de hidrólise utilizando a FES, sendo a matriz sólida composta por diversos resíduos agroindustriais, são apresentados em detalhes na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Descrição de alguns substratos naturais e microrganismos envolvidos na fermentação em estado sólido para produção de lipases com atividade de hidrólise

<i>Substrato</i>	<i>Atividade (U/g)</i>	<i>Método Dosagem Substrato</i>	<i>Microrganismo</i>	<i>Referências</i>
Farelo de soja	19,2	Titulométrico (óleo oliva)	<i>Penicillium</i> sp.	Griebeler et al., (2009)
Farelo de Soja	15,2	Titulométrico (óleo oliva)	<i>Penicillium</i> sp.	Wolski et al., (2009b)
Farelo de Soja	40,0	Titulométrico (óleo oliva)	<i>P. verrucosum</i>	Kempka et al. (2008)
Farelo de Soja	30,0	<u>Titulométrico (óleo oliva)</u>	<u>P. simplicissimum</u>	Vargas et al. (2008)
Torta de babaçu	30,0	<u>Titulométrico (óleo oliva)</u>	<u>P. simplicissimum</u>	Gutarra et al. (2007)
Torta de babaçu	17,4	<u>Titulométrico (óleo oliva)</u>	<u>P. simplicissimum</u>	Azeredo et al. (2007)
Torta de babaçu	26,4	<u>Titulométrico (óleo oliva)</u>	<u>P. simplicissimum</u>	Gutarra et al. (2005)
Torta de babaçu	26,4	<u>Titulométrico (óleo oliva)</u>	<u>P. simplicissimum</u>	Cavalcante et al. (2005)
Torta de soja	21,0	Titulométrico (óleo oliva)	<i>P. simplicissimum</i>	Di Luccio et al. (2002)
Torta de babaçu	30,3	<u>Titulométrico (óleo oliva)</u>	<u>P. restrictum</u>	Gombert et al. (1999)
Torta de babaçu	27,8	<u>Titulométrico (óleo oliva)</u>	<u>P. restrictum</u>	Palma et al. (2000)
Farelo de trigo	630, 0	<u>Espectrofométrico (pNPP)</u>	<u>A. niger NCIM1207</u>	Mahadik et al. (2002)
Torta de gergelim	363,6	<u>Titulométrico (óleo oliva)</u>	<u>A. niger MTCC2594</u>	Kamini et al. (1998)
Farelo de trigo (FT)	271,6	<u>Titulométrico (óleo oliva)</u>	<u>A. niger MTCC2594</u>	Mala et al. (2007)
Torta de gergelim+(FT)	384,3	<u>Titulométrico (óleo oliva)</u>	<u>A. niger MTCC2594</u>	Mala et al. (2007)

Continua...

<i>Substrato</i>	<i>Atividade (U/g)</i>	<i>Método Dosagem Substrato</i>	<i>Microrganismo</i>	<i>Referências</i>
Continuação				
Torta de oliva	79,6	Colorimétrico (piridina)	<i>R. rhizopodiformis</i>	Cordova et al. (1998)
Torta amêndoas	48,0	<u>Titulométrico</u>	<u>R. oligosporus</u>	Ul-Haq et al. (2002)
Bagaço de cana	826,0	<u>Colorimétrico (piridina)</u>	<u>R. homothallicus</u>	Rodriguez et al. (2006)
Bagaço de cana	1500,0	<u>Titulométrico (trioleína)</u>	<u>R. homothallicus</u>	Diaz et al. (2006)
Casca de arroz	23,3	<u>Titulométrico (óleo oliva)</u>	<u>C. glosesporioides</u>	Colen et al. (2006)
Farelo de trigo	69,0	<u>Titulométrico (tributirina)</u>	<u>Y. lipolytica</u>	Domínguez et al. (2003)

O acompanhamento da produção de protease durante o processo de biosíntese da lipase em FES é um fator importante. Em média, o aumento do pH após algumas horas de fermentação é acompanhado com o aumento dos níveis de protease, comportamento provável devido à degradação de aminoácidos que liberam amônia no meio. Assim o tipo de suplemento está diretamente correlacionado à produção e a estrutura da proteína (Palma et al., 2000). O controle de pH pode então ser indispensável para certos processos de FES, mas a não homogeneidade dos sistemas em meio sólido é uma dificuldade. Pode-se aplicar para correção e manutenção do pH no meio os sais de amônio e uréia e ou uso de agentes tamponantes (Nagel et al., 1999).

2.3.4 Variáveis do processo de fermentação em estado sólido

Alguns aspectos são de extrema importância para um bom desenvolvimento do processo de fermentação em estado sólido. No aspecto da Engenharia, alguns fatores devem ser levados em consideração como o comportamento de transferência de calor e massa do sistema, projeto, escalonamento do processo e o monitoramento e controle das reações, do sistema de aeração e umidificação. Não menos importantes são os parâmetros biológicos do processo, como, efeito da composição de nutrientes do meio em termos da fonte de carbono, nitrogênio, sais e indutores, a temperatura, valores de pH, umidade, concentração do inóculo e ainda a porosidade do meio.

O material ou matriz sólida usada na FES possui baixa

condutividade térmica e conseqüentemente a remoção do calor do processo pode ser baixa. Assim o acúmulo de calor no decorrer da fermentação pode ocasionar a desnaturação dos produtos formados, sendo que o controle do aquecimento está relacionado com a capacidade de aeração do sistema (Pandey, 2003).

Alta umidade resulta na diminuição da porosidade do substrato dificultando a penetração do oxigênio. Por outro lado, a baixa concentração de água pode piorar o acesso aos nutrientes, diminuindo o crescimento dos microrganismos. Assim a atividade de água (a_w) é um parâmetro fundamental de controle (Pandey, 2003).

Entre os fatores limitantes da FES que requerem soluções para o escalonamento do processo destacam-se a formação de gradientes de umidade, pH, temperatura, oxigênio e distribuição do inóculo e substrato pela dificuldade de mistura (Rodriguez et al., 2006; Holker e Lenz, 2005; Chen et al., 2005; Couto e Sanromán, 2005; Holker et al., 2004; Raghavarao et al., 2003).

O processo de transferência de massa envolvido na FES pode ser dividido em escalas micro e macro. Na micro-escala o fator limitante é a natureza do microrganismo onde o crescimento depende da difusão dos gases inter e intrapartícula como também das enzimas, nutrientes e produtos do metabolismo. O processo em macro-escala envolve os processos de convecção natural, difusão e condução; a condução pela parede do biorreator e o resfriamento convectivo para o ambiente; a dimensão da vazão de ar necessária, os problemas de mistura no biorreator, incluindo a questão da integridade das partículas do substrato (Raghavarao et al., 2003).

Com o andamento da fermentação, ocorre um encolhimento do leito de substrato e a porosidade diminui, podendo ocorrer, posteriormente, a interrupção da transferência de calor gerado no sistema. Assim, o gradiente da temperatura no leito pode aumentar. A transferência de calor gerado no sistema de FES é um fator a ser controlado no decorrer do processo por estar diretamente correlacionada com a atividade metabólica do microrganismo. O desenvolvimento de equipamentos que proporcionem uma boa transferência de calor é um fato importante e, em geral, em escala industrial utiliza-se o fermentador com tambor rotativo, eficiente neste aspecto (Chen et al., 2005; Raghavarao et al., 2003).

Recentemente avaliou-se o emprego de pulsação de ar pressurizado e circulação interna de ar para acelerar a transferência entre o substrato e o ar externo. O controle da temperatura durante a FES com *Penicillium decumbens* JUA 10 é relatado com o uso desta técnica,

mostrando-se eficiente no controle efetivo da temperatura do sistema devido a possibilidade a remoção do calor formado. No entanto, deve-se tomar alguns cuidados com as taxas de pulsação de ar, pois quando estas forem maiores que 0,20MPa podem afetar o desenvolvimento do microrganismo, e assim ocasionar a diminuição da produtividade do bioprocessamento (Chen et al., 2005).

A possibilidade de que temperaturas possam causar significativa desnaturação da enzima durante o processo de fermentação é um questionamento em relação ao mecanismo de controle da temperatura nos sistemas de FES. A modelagem matemática da desnaturação da enzima pode ser uma ferramenta usada para investigação deste comportamento através de dados existentes e parâmetros desenvolvidos, possibilitando a produção de enzimas e outros produtos termolábeis (Holker e Lenz, 2005; Santos et al., 2004).

A porosidade do leito da fermentação em estado sólido e a área superficial são fatores investigados em pesquisa durante a fermentação com *Aspergillus oryzae* em farelo de trigo e grãos de trigo. Há uma importante relação entre a taxa de oxigênio distribuído e o espaço entre as partículas de substrato. Assim, o aumento da porosidade do leito através do uso de menores ou um maior número de partículas do substrato é uma forma de facilitar os processos de transferência durante a fermentação em estado sólido. Outro fator de extrema importância é a formação do micélio aéreo do fungo no leito do suporte, pois este possui relação direta com a velocidade de formação da enzima (Rahardjo et al., 2005).

Partículas menores do substrato sempre resultam em uma maior área superficial para o desenvolvimento dos microrganismos. No entanto, o uso de partículas muito pequenas pode também resultar na aglomeração do substrato e, desta forma, dificultar o crescimento das células microbianas. Por outro lado, partículas maiores melhoram a aeração do sistema, mas a área superficial é diminuída, dificultando os processos de transferência de massa e de calor. Assim, o tamanho das partículas é um fator particular para cada processo (Couto e Sanromán, 2005). Para aumentar o desempenho da FES, alguns fatores devem ser ajustados de acordo com a especificidade do microrganismo e o substrato usado, facilitando a formação do micélio e contribuindo para formação da enzima hidrolítica (Rahardjo et al., 2005).

A preparação do inóculo de fungos é avaliada quanto à sua influência em processos de FES, comparando-se à inoculação com esporos extraídos do meio sólido, como *pellets* obtidos do crescimento dos fungos em meio líquido. O efeito do tempo de propagação e

concentração do inóculo são também considerações relevantes para o momento do estudo da produção de enzimas. Aumento de produção de 1,5 vezes foi obtido quando matriz sólida foi inoculada com *pallets* do fungo comparado ao inóculo com esporos (Gutarra, et al., 2007).

2.4 Purificação de extratos enzimáticos

A etapa de purificação é importante para a obtenção de enzimas com alto grau de pureza e com maiores níveis de atividade enzimática. O processo de purificação é fundamental na obtenção e aplicação industrial de uma enzima. Após a fermentação, a enzima encontra-se no meio contendo uma série de outros compostos que não são de interesse (Maldonado, 2006). Independentemente da fonte de lipase ou da técnica empregada, a purificação tem uma capacidade limitada no que se refere ao aumento da atividade específica (Gupta et al., 2004).

Os processos com membrana podem ser usados em operações de *downstream*, ou seja, para redução de volume do processo, em etapa de concentração dos produtos, bem como na eliminação de impurezas contidas junto aos compostos de interesse (Wang, 2001). Em etapas preliminares da purificação de lipases, reporta-se o uso de membranas para remoção de células microbianas e concentração das enzimas. A purificação de lipase de *Pseudomonas fluorescens* segundo Makhzoum et al. (1995) pode ser realizada através de três etapas, iniciando com a ultrafiltração, a precipitação com sulfato de amônio e finalmente com a cromatografia de interação hidrofóbica (HIC). Segundo Wang et al. (2009); Shu et al. (2006) e Saxena et al. (2003b), em duas etapas, a precipitação e aplicação da referida técnica cromatográfica. A cromatografia de troca iônica também foi utilizada para purificação de lipase de *Aureobasidium pulluans* HN2.3 (Liu et al., 2008), *Bacillus coagulans* BTS-3 (Kumar et al., 2005) e *Bacillus* sp. RSJ-1 (Sharma et al., 2002), sendo a técnica de ultrafiltração utilizada como procedimento anterior a aplicação da cromatografia (Takaç e Marul, 2008). A técnica de ultrafiltração foi aplicada como etapa final do processo de *downstream* da lipase de *Yarrowia lipolytica* na pesquisa desenvolvida por Fickers et al. (2006).

A técnica de precipitação das proteínas com sais, aplicada como pré-tratamento do meio contendo a enzima de interesse, consiste em uma das técnicas de concentração de proteínas para separação das mesmas dos outros compostos do meio, facilitando os processos subsequentes devido à ausência de possíveis interferentes (Martins et al.,

2008). A concentração pela adição de sais, como sulfato de amônio, baseia-se no aumento da força iônica, de tal forma que as moléculas protéicas se agregam e precipitam (Borzani et al., 2001).

Para remoção do sal utilizado na etapa de concentração da amostra de proteína pode-se utilizar a diálise, em condições que preservem a atividade da enzima. A lipase de *Bacillus coagulans* BTS-3 foi purificada através de uma série de etapas, iniciando com a concentração com sulfato de amônio seguida de diálise (Kumar et al., 2005). O processo de purificação utilizado para lipase de *Pseudomonas* sp. foi a precipitação com sulfato de amônio (80% saturação), seguida de diálise aumentando em 6 vezes o fator de purificação (Kiran et al., 2008).

Da mesma forma, os procedimentos de diafiltração com membranas podem ser aplicados para remoção de compostos utilizados no processo, que devem ser retirados de forma a evitar alterações. Para eliminação destes compostos, são adicionados volumes complementares de soluções que possibilitam a lavagem e eliminação de solutos indesejáveis (Wang, 2001), pequenos componentes do sistema, retendo espécies de interesse (Zeman e Zydny, 1996).

A diafiltração é o processo de "lavagem" aplicada em um sistema de interesse, através da adição de soluções tampão adequadas, sendo este procedimento repetido o número de vezes necessário a se obter a concentração final do soluto desejada. A diafiltração pode ser realizada de forma contínua ou descontínua, revelando características peculiares a cada procedimento quanto ao diavolume usado x tempo necessário ao procedimento, podendo este variar, como no caso do estudo da remoção de lactose em sistema específico para purificação de proteína, de 1 a 5 diavolumes (Zeman e Zydny, 1996).

O sulfato de amônio é bem reportado para precipitação de lipases sendo que as concentrações utilizadas variam de acordo com os estudos: 80% de saturação foi utilizado na precipitação de lipases produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* (Karadzic et al., 2006) e *Pseudomonas fluorescens* (Makhzoum et al., 1995); 70% para *Antrodia cinnamomea* (Shu et al., 2006) e *Bacillus* sp.RSJ-1 (Sharma et al., 2002); 60% para *Bacillus coagulans* MTCC-6375 (Kanwar et al., 2006) e *Antrodia cinnamomea* (Shu et al., 2006); 40% para *Clostridium tetanomorphum* (Petersen e Daniel, 2006) e 20% para *Favobacterium odoratum* (Labuschagne et al., 1997).

A avaliação do uso de diferentes concentrações de sulfato de amônio para precipitação da lipase produzida através do sistema de FES com *Penicillium verrucosum* foi estudada através de planejamento

experimental, abrangendo a faixa de 32 a 88% de saturação. A concentração de 60% de saturação foi apresentada como a que resultou no maior de atividade específica (0,91 U/mg) após 5 horas de precipitação a temperatura ambiente (25°C). Deve-se ressaltar ainda que o processo de diálise não apresentou efeito no aumento da atividade da proteína em relação à precipitada (Menoncin et al., 2008).

Em algumas situações, como no caso da aplicação da cromatografia de interação hidrofóbica (gradiente salino para desorção de proteína) como uma etapa de purificação, o sal utilizado no processo de precipitação (sulfato de amônio 40%), aplicado preliminarmente ao sistema de cromatografia, não necessita ser retirado da amostra, de acordo com o relatado por Petersen e Daniel (2006), onde estes avaliaram a purificação da lipase produzida por *Clostridium tetanomorphum*. Este procedimento também foi usado para purificação da lipase de *Pseudomonas fluorescens*, sendo a saturação do sulfato de amônio 80% (Makhzoum et al., 1995).

2.5 Características bioquímicas

A caracterização bioquímica das enzimas ganha destaque por fornecer dados para compreender a atuação e as alterações ocorridas, além de fornecer dados que devem ser considerados no momento da aplicação da enzima em um processo. Temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e com pH, e outros parâmetros são decisivos na hora do dimensionamento de um processo enzimático.

Estudos sobre o mecanismo de ação das lipases visam auxiliar pesquisa sobre reações específicas de interesse comercial na produção de novos compostos biotecnológicos. O potencial de produção de ésteres com lipases produzidas através da FES sem aplicação preliminar de processos de extração e purificação vem sendo pesquisado para uso em reações biocatalíticas, como a síntese do etil oleato avaliado por Ruiz et al. (2004), com possibilidade de aplicação para produção sustentável de produtos como o biodiesel de óleos vegetais. Contudo, as lipases devem ser selecionadas para cada aplicação, sendo que estas podem ser baseadas na especificidade do substrato, posição e **estereoespecificidade**, bem como, temperatura e pH de estabilidade (Carvalho et al., 2008).

2.5.1 Avaliação de temperatura e pH

Quanto à avaliação da estabilidade de enzimas microbianas, muitos resultados são encontrados na literatura, embora a comparação profunda destes torna-se difícil já que diferentes métodos fermentativos, meios e microrganismos são empregados, bem como, diferentes sistemas e grau de purificação. A estabilidade frente a diferentes faixas de pH, normalmente é realizada em torno da neutralidade, mas também 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 et al., 2004).

Muitas lipases são reportadas como termoestáveis e específicas a vários substratos, características importantes no desenvolvimento de processos em especial que objetivam reutilizar as enzimas. Estas apresentam consequentemente consideráveis estabilidade da atividade. Fungos termofílicos e termotolerantes podem ser fonte potencial para produzir enzimas com altos níveis de estabilidade térmica e atividade a temperaturas mesofílicas. As lipases extracelulares purificadas produzidas pelo fungo termotolerante *Rhizopus homothallicus* em FES e FS, apresentaram máxima atividade a 40°C e 30°C, respectivamente. A avaliação da estabilidade térmica a 50°C resultou em tempo de meia-vida de 0,72 h e 0,44 h para os sistemas de FES e FS, respectivamente (Diaz et al., 2006).

Na Tabela 2.3 pode-se visualizar os distintas temperaturas e pH ótimos obtidas para lipases microbianas em estado bruto e purificadas produzidas em diferentes sistemas de fermentação.

Destacam-se a avaliação de temperatura e pH ótimo e de estabilidade para lipase produzidas em FES utilizando farelo de soja com substrato suporte. Dentre os trabalhos realizados são relatadas pesquisas recentes, o efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade da lipases produzida por *Penicillium verrucosum*. O extrato lipolítico bruto apresentou pH e temperatura ótima, em pH 7 e 44 °C, sendo estável a 35°C na faixa de pH 6-7 (Kempka et al., 2008). O extrato bruto de *Penicillium* sp. (Wolski et al., 2009b) apresentou pH ótimo e de estabilidade igual a 7, sendo que a temperatura ótima foi 37°C, com tempo de meia-vida de 76 h a 25°C.

Já o extrato pré-purificado através da técnica de precipitação com sulfato de amônio (60% saturação) produzido também em FES com farelo de soja fermentado com *Penicillium verrucosum* apresentou os

valores de ótimo, de pH 8,5 e temperatura 42°C (Menoncin et al., 2008).

Tabela 2.3 - Descrição de temperaturas e pH ótimos para lipases brutas e purificadas produzidas em diferentes sistemas de fermentação e culturas microbianas.

<i>Forma Enzima</i>	<i>Microrganismos</i>	<i>Sistema Fermentação*</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Referências</i>
Bruta	<i>Penicillium verrucosum</i>	FES	44	7,0	Kempka et al.(2008)
	<i>Penicillium</i> sp.	FS	37-42	4,9-5,5	Wolski et al.(2009a)
	<i>Aspergillus niger</i>	FES	37	7	Kamini et al.(1998)
	<i>Aspergillus niger</i>	FES	4 – 8	3-6,5	Romero et al.(2007)
	<i>Aspergillus niger</i>	FES	45	2,5	Mahadik et al.(2002)
	<i>Antrodia cinnamomea</i>	FS	60	11	Lin e Ko (2005)
	<i>Antrodia cinnamomea</i>	FS	45	8	Shu et al.(2006)
	<i>Geotrichum</i> sp.	FS	37 e 50		Ginalska et al. (2004)
	<i>Bacillus coagulans</i>	FS	45	8,5	Kanwar et al. (2006)
	Purificada	<i>Penicillium verrucosum</i>	FES	42	8,5
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>		FS	60	8,0	Lima et al. (2004)
<i>Aspergillus carneous</i>		FS	37	9	Saxena et al.(2003b)
<i>Aureobasidium pullulans</i>		FS	30	8,5	Liu et al.(2008)
<i>Bacillus</i> sp.		FS	60	9,5	Wang et al. (1995)
<i>Bacillus coagulans</i>		FS	55	8,5	Kumar et al.(2005)
<i>Bacillus</i> sp.		FS	50	8-9	Sharma et al.(2002)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		FS	70	11	Karadzic et al.(2006)
<i>Pseudomonas</i> sp.		FS	37	9	Kiran et al.(2008)
<i>Pseudomonas monteillii</i> (F ₁)		FS	40	6	Wang et al.(2009)
<i>Pseudomonas monteillii</i> (F ₂)		FS	40	7	Wang et al.(2009)

* Fermentação estado sólido (FES) -

Fermentação submersa (FS)

Na Tabela 2.4 pode-se visualizar dados da literatura que descrevem o comportamento quanto à estabilidade a pH e temperatura de lipases microbianas em estado bruto e purificadas produzidas em diferentes sistemas de fermentação.

Tabela 2.4 - Descrição de temperaturas e pH de estabilidade para lipases brutas e purificadas produzidas em diferentes sistemas de fermentação e culturas microbianas.

<i>Forma Enzima</i>	<i>Microrganismos</i>	<i>Sistema Fermentação</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Parâmetro Estabilidade</i>	<i>Referências</i>
Bruta						
	<i>Aspergillus niger</i>	FES	4-50	4-10	80%/1 h	Kamini et al.(1998)
	<i>Aspergillus niger</i>	FES	25-40	7-10	100%/1 h	Romero et al.(2007)
	<i>Aspergillus niger</i>	FES	50	5-7	100%/5 h	Mahadik et al.(2002)
	<i>Aspergillus niger</i>	FES	25	5-7	80%/24 h	Mahadik et al.(2002)
	<i>Penicillium sp.</i>	FES	25	7	$t_{1/2}=76$ h	Wolski et al. (2009b)
	<i>Antrodia cinnamomea</i>	FS	80	7-12	57%/1 h	Lin e Ko (2005)
	<i>Candida rugosa</i>	FS	30	nd	$t_{1/2}=120$ h	Casa et al. (2006)
	<i>Geotrichum sp</i>	FS	60	nd	75%/1 h	Ginalska et al.(2004)
Purificada						
	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	FS	28	6 -8	80%/1 h	Lima et al.(2004)
	<i>Penicillium sp.</i>	FS	60	7-9	93%/1 h	Prazeres et al. (2006)
	<i>Aspergillus cerneous</i>	FS	70	nd	55%/0,16h	Saxena et al. (2003b)
	<i>Rhizopus homothallicus</i>	FES	50	nd	$t_{1/2}=40$ min	Diaz et al.(2006)
	<i>Rhizopus homothallicus</i>	FS	50	nd	$t_{1/2}=26$ min	Diaz et al.(2006)
	<i>Bacillus sp.</i>	FS	75	nd	$t_{1/2}=8$ h	Wang et al. (1995)
	<i>Bacillus coagulans</i>	FS	70	8-10,5	$t_{1/2}=18$ min	Kumar et al.(2005)
	<i>Bacillus sp.</i>	FS		8-9	$t_{1/2}=2$ h	Sharma et al.(2002)
	<i>Bacillus sp.</i>	FS	60	8	$t_{1/2}=170$ h	Nawani e Kaur (2007)
Continua...						

<i>Forma Enzima</i>	<i>Microorganismos</i>	<i>Sistema Fermentação</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Parâmetro Estabilidade</i>	<i>Referências</i>
Continuação						
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FS	60	4-11,5	75%/15min	Karadzic et al. (2006)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	FS	20	nd	80%/1h	Kiram et al. (2008)
	<i>Pseudomonas monteillii</i> (F ₁)	FS	50	nd	70%/1h	Wang et al. (2009)
	<i>Pseudomonas monteillii</i> (F ₂)	FS	60	nd	70%/1h	Wang et al. (2009)
	<i>Antrodia cinnamomea</i>	FS	20-40	nd	50%/1h	Shu et al. (2006)
	<i>Antrodia cinnamomea</i>	FS	25	7-10	80%/24h	Shu et al. (2006)
	<i>Bacillus coagulans</i>	FS	55	nd	79%/18 min	Kanwar et al. (2006)

2.5.2 Especificidade ao substrato

A literatura relata que a especificidade das lipases é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação enzima-substrato (Jensen et al., 1983). Há vários tipos de especificidade: 1) quanto ao substrato: uma enzima pode apresentar diferentes taxas de hidrólise sobre triacilgliceróis, diacilgliceróis ou monoacilgliceróis; 2) posicional: a hidrólise ocorre diferentemente sobre ésteres primários, secundários ou terciários, ou pode ser inespecífica, liberando ácidos graxos das três posições; 3) quanto aos ácidos graxos que compõem o substrato: preferência por ácidos graxos específicos, principalmente quanto ao comprimento da cadeia e número de insaturações; 4) estereoespecificidade: discriminação entre enantiômeros no caso de substratos racêmicos.

Do ponto de vista biotecnológico, a utilização de sistemas reacionais em solventes orgânicos apresenta muitas vantagens, como alta solubilidade dos substratos e produtos, reversão da reação hidrolítica e modificação da especificidade da enzima, o que justifica a pesquisa sobre a utilização de enzimas em ambientes “aquos-restritos” (Klibanov, 1989). Contudo, ainda existem muitas limitações associadas à aplicação de lipases brutas em meio de solvente orgânico, relacionadas aos fatores que controlam a atividade catalítica deste sistema reacional. A proporção de isoenzimas que compõe o biocatalisador, o conteúdo de água existente na enzima bruta liofilizada, bem como o conteúdo de proteína de interesse no material em pó comercializado (Maria e Gago,

1999).

A atividade hidrolítica em diferentes triacilgliceróis (C4:0 – C18:2), metil ésteres (C12:0 – C18:1) e óleos e gorduras foram estudados em sistemas aquosos usando lipase de *Bacillus stearothermophilus* SB-1 e *Burkholderia cepacia* RGP-10. As lipases de ambas culturas apresentaram seletividade por alguns óleos ricos em ácidos graxos insaturados, bem como a triglicerídeos de cadeia média (C14:0) para *B. stearothermophilus* SB-1 e longa (C18:2) para *B. cepacia* RGP-10. As mesmas culturas liofilizadas tiveram a atividade de esterificação avaliada frente a diferentes ésteres graxos sendo os ésteres de cadeia média (C14:0) e cadeia longa (C18:1) para cada lipase citada como os que resultaram em maior percentual de atividade de síntese (Bradoo et al., 2002).

A especificidade a diferentes ésteres da lipase purificada de *Bacillus coagulans* MTCC-6375 produzida em FS foi avaliada, resultando em 100% atividade lipásica em éster de cadeia média (C8:0) *p*-nitrofenol caprilato (*p*NPC), apresentando potencial de aplicação na síntese de ésteres de cadeia curta em meio orgânico através do desempenho de reação de esterificação e transesterificação. Uma boa performance foi também observada em éster de cadeia longa (C16:0), *p*-nitrofenol palmitato (*p*NPP) (Kanwar et al., 2006), sendo este éster (*p*NPP) o mais específico para lipase purificada de *Bacillus coagulans* BTS-3 dentre os avaliados (Kumar et al., 2005). A lipase concentrada de *Bacillus* sp. A30-1 foi mais específica na hidrólise a triglicerídeos de cadeia média, como a trilaurina (C12:0), seguida de tricaprilina (C10:0) e trilinoleína (C18:2), bem como dos óleos vegetais de algodão, soja e gérmen de trigo (Wang et al., 1995).

A atividade da lipase purificada de *Aspergillus carneus* foi avaliada em diferentes óleos vegetais, apresentando atividade em vários triglicerídeos (C4-C18), mas apresentando preferência por triglicerídeos com ácidos graxos de cadeia média (C12:0), bem como alta especificidade pelo éster *p*-nitrofenil laurato (C12:0), 5 vezes maior em relação ao *p*-nitrofenil palmitato (C16:0) (Saxena et al., 2003b). Comportamento similar foi observado quando substratos cromogênicos, ésteres graxos de *p*-nitrofenol, foram usados nas reações com lipases extracelulares produzidas pelo fungo termotolerante *Rhizopus homothallicus* em FES e FS, sendo a máxima atividade observada quando o éster graxo de cadeia média (C:8) era usado (Diaz et al., 2006). *Rhizopus orzae* produziu lipase extracelular com alta especificidade aos substratos metil caprilato (C8:0) e tricaprilina (C10:0) (Razak et al., 1997).

O comportamento relativo à especificidade que a lipase bruta de *Fusarium oxysporum* produzida em FS apresentou por triglicerídeos de cadeia média (C8-C12) e longa (C18), sugere-se que a enzima usada neste estudo é uma lipase verdadeira portanto, (Prazeres et al., 2006). Este comportamento foi também observado durante a avaliação da especificidade da lipase bruta de *Penicillium aurantiogriseum* frente a diversos substratos, sendo que esta aumenta de acordo com o aumento da cadeia dos ésteres, *p*-nitrofenil butirato (C4:0) a *p*-nitrofenil palmitato (C16:0). Contudo, o uso do *p*NPP para caracterizar atividade lipolítica e *p*NPA para esterases pode não ser totalmente verídico, já que algumas esterases podem também hidrolisar *p*NPP. Portanto sugere-se utilizar o método do *p*NPP como medida da atividade lipolítica somente após verificar-se que a enzima seja capaz de hidrolisar triacilglicerídeos (Lima et al., 2004).

A lipase purificada de *Pseudomonas fluorescens*, segundo Makhzoum et al. (1995), apresentou preferência aos substratos tricaproína (C6:0), tricaprilina (C8:0) e tricaprina (C10:0). Quando a tricaprilina (C8:0) foi usada na reação para lipase de *Pseudomonas aeruginosa*, a maior atividade foi obtida seguida de tricaprina (C10:0) e tricaproína (C6:0) (Karadzic et al., 2006). O estudo da especificidade das lipases (F1 e F2) de *Pseudomonas monteilii* TKU009 frente a ésteres graxos de *p*-nitrofenol, revelou alta especificidade da F1 pelo éster *p*-nitrofenil caprilato (C8:0) e da F2 pelo éster *p*-nitrofenil miristato (C14:0) (Wang et al., 2009). No caso da *Pseudomonas fluorescens* HU380 a maior atividade foi observada quando os substratos de curta e média cadeia foram usados na reação, sendo os de maiores atividades o metil caproato e a tributirina (C4:0) (Kojima e Shimizu, 2003). Na avaliação da lipase purificada de *Flavobacterium odoratum*, os autores verificaram que esta possuía ampla especificidade aos substratos monoésteres sintéticos, com preferência aos de cadeia longa (C18:2) (Labuschagne et al., 1997).

A influência de diferentes fontes de lipídios, para uso como substrato da reação de hidrólise, com lipase de *Aureobasidium pullulans* HN2.3, foi pesquisada por Liu et al., (2008), buscando verificar de forma ampla a possibilidade de aplicação, através do uso de substratos naturais como, gordura animal (banha) e alguns óleos vegetais como de amendoim, soja e oliva. Os resultados revelaram que a lipase purificada foi hábil ao hidrolisar todas as fontes de lipídios propostas no estudo, sendo a maior atividade obtida com óleo de amendoim (106 U/mg proteína), seguida óleo de oliva, banha e óleo de soja (58, 51 e 43 U/mg proteína, respectivamente). Da mesma forma, a lipase bruta alcalina

obtida através da FES com fungo *Colletotrichum gloesporioides*, apresentou na tributirina maior atividade, seguida de óleo de canola, soja, girassol e milho, sendo a menor atividade observada em gordura animal (Colen et al., 2006). Estes resultados asseguram o potencial de aplicação das lipases produzidas em reações de degradação e reuso dos materiais gordurosos naturais usados na avaliação da especificidade da reação enzimática (Liu et al., 2008) e ou na obtenção de produtos biotecnológicos de interesse.

CAPITULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais, procedimentos experimentais e a metodologia analítica utilizados para o desenvolvimento do estudo relacionado à produção e caracterização de lipases extracelulares obtidas por fermentação em estado sólido (FES) em farelo de soja com microrganismos selecionados.

3.1 Materiais

Os principais reagentes e meios de cultura utilizados no decorrer deste trabalho foram:

- Acetona (Quimex);
- Albumina (Sigma A3294)
- Ácido sulfúrico concentrado (Quimex)
- Ácido bórico (Nuclear)
- Fosfato de sódio mono e dibásico (Nuclear)
- *n*-hexano (Nuclear)
- Pastilha catalisadora (sulfato de potássio e selênio)(Velp Científica)
- Biftalato de Potássio (Nuclear);
- Comassie Brillante Blue G (Sigma);
- Etanol 95% (Quimex);
- Farelo de soja (Olfar);
- Fenolftaleína (Nuclear);
- Fosfato de sódio monobásico (Vetec);
- Fosfato de sódio dibásico (Vetec);
- Goma acácia (arábica) (Synth);
- Hidróxido de sódio (Nuclear);
- Meio BDA (Batata, Dextrose, Agar, composição após o preparo (39 g em 1 L): 4 g/L de infusão de batata, 20 g/L de glicose e 15 g/L de ágar) (Acumedia);
- Metanol seco (máx. 0,005% H₂O) (Merck);
- Etanol seco (máx. 0,005% H₂O) (Merck);
- Butanol seco (máx. 0,005% H₂O) (Merck);
- *n*-propanol (Vetec);

- Óleo de oliva (Arisco, acidez < 0,5%), óleo de soja (Soya);
- Sulfato de amônio (Synth);
- Uréia (Synth);
- Solução de K-Fisher (CombiTitrant 5) (Merck);
- Tween 80 (Vetec);
- Tris-HCl (Tris hidroximetil-aminometano) (Merck);
- *p*-nitrofenol (Aldrich);
- *p*-nitrofenil butirato, laurato, estearato, palmitato (Sigma).

3.2 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados neste estudo foram os seguintes:

- Agitador orbital (Marconi MA-410);
- Agitador magnético (Fisatom);
- Banho agitador (Nova Ética);
- Balança analítica (Bel Engineering);
- Câmara de fluxo laminar (Pachane);
- Freezer -80°C (Hitachi);
- Centrífugas refrigeradas (Nova Técnica);
- Dessecador com sílica (Vidralabor, Thermex);
- Destilador Kjeldahl (Marconi, modelo MA036);
- Extrator de Soxhlet (Marconi, modelo MA491);
- Centrífuga Hettich (modelo Mikro 20);
- Microondas Philco (modelo PMW 110);
- Microscópio (Leica);
- Espectrofotômetro (Agilent Technologies 8453);
- Germinadora para incubação (Tecnal TE-401);
- Estufa com circulação de ar (Fanem, modelo 320SE);
- Karl Fisher e titulador automático (Mettler Toledo DL 50 Graphix);
- Medidor de pH digital (Gehaka, modelo PG2000);
- Liofilizador (Edwards Modulyo);
- Mixer manual (Black & Decker).

3.3 Métodos

Nesta seção serão apresentadas detalhadamente as metodologias

experimentais empregadas para obtenção de lipases extracelulares com atividade de hidrólise e síntese, através da fermentação em estado sólido (FES) em farelo de soja com microrganismos selecionados. De forma sucinta, podem-se seccionar as etapas da pesquisa nos seguintes itens:

- 1) Isolamento e seleção de microrganismos produtores de lipase com atividade hidrolítica e de esterificação
 - a) Isolamento de microrganismos de fontes potenciais como solo, alimentos gordurosos deteriorados e farelo de soja deteriorado.
 - b) Seleção dos microrganismos

Produtores de lipases hidrolíticas

- Fungos filamentosos em meio sólido
- Fungos filamentosos, leveduras e bactérias através da FES
- Identificação quanto ao gênero dos microrganismos selecionados através da técnica de microcultivo.

Produtores de lipases com atividade de esterificação

- Fungos filamentosos, leveduras e bactérias através da FES

2) Avaliação da especificidade dos extratos enzimáticos com atividade de esterificação

- Álcoois metanol, etanol, n-propanol e butanol
- Ácidos láurico (C12:0) e oleico (C18:1)

3) Estudo da produção de lipase hidrolítica

a) Avaliação cinética da produção de lipase hidrolítica através das cepas de *Penicillium* 58F e 74F. Dosagem de atividade em óleo de oliva em pH 4, 7 e 9.

- Suplementação do farelo de soja com óleo de soja, uréia e resíduos agroindustriais (água de maceração de milho, hidrolisado de levedura e melão de cana de açúcar).
- Avaliação do efeito da temperatura, umidade, concentração do suplemento, concentração de esporos e granulometria do farelo de soja na produção da lipase.

- Avaliação do efeito da proporção de C/N no meio para fermentação.
- b) Estudo do efeito do pH do solvente, temperatura, agitação e razão sólido:líquido na extração das lipases do meio sólido fermentado com *Penicillium* 58F.
 - c) Determinação do pH e temperatura ótima da reação de dosagem da atividade enzimática da lipase produzida com *Penicillium* 58F.
- 4) Caracterização bioquímica de lipase hidrolítica produzida com *Penicillium* 58F
- a) Pré-purificação do extrato enzimático através da precipitação com sulfato de amônio e posterior diafiltração.
 - b) Determinação da estabilidade da lipase bruta e pré-purificada liofilizada, em termos de temperatura e pH.
 - c) Avaliação da especificidade a diferentes substratos.
 - Especificidade a diferentes triglicerídeos como tributirina, trioleína, tricaprilina, óleo de oliva e soja.
 - Ésteres comerciais do p-nitrofenol (laurato, estearato, palmitato, butirato).

3.3.1 Isolamento e seleção de microrganismos

3.3.1.1 Material biológico

Os microrganismos foram isolados a partir de amostras de solo e alimentos deteriorados como azeite de oliva, requeijão, queijo minas, extrato de tomate, óleo de soja, nata, creme de leite, carne, maionese e também de amostras de farelo de soja deteriorado e contaminações existentes em meios de cultura.

Para o isolamento e cultivo dos microrganismos, as amostras foram suspensas (1 g) em 9 mL de solução salina (0,9%) estéril e homogeneizadas. Com auxílio de pipetador, 0,3 mL do líquido sobrenadante foram transferidos por meio de ponteiros estéreis a placas de Petri com meio contendo ágar, amido e dextrose (BDA), espalhada sobre a superfície com auxílio de alça de Drigalski e então incubada a 30°C em estufa.

Para diferenciar as leveduras de possíveis bactérias que tenham

crescido no meio de isolamento (BDA) foram preparadas lâminas a fresco, colocando-se uma gota de fluido contendo o microrganismo em uma lâmina de vidro, efetuando a cobertura com uma lamínula para, em seguida, ser examinada em microscópio.

3.3.1.2 Manutenção das cepas

a) Fungos filamentosos

As cepas de fungos filamentosos isoladas foram crescidas em BDA durante sete dias a 30°C e então as colônias foram raspadas através de alça de platina e adicionadas em tubos com solução aquosa esterilizada contendo 50% de glicerina bi-distilada (87% pureza), Tween 80 (0,1% v/v) e NaCl (0,9 %m/v). A solução contendo os esporos foi transferida para criotubos de 1,5 mL estéreis e conservada a -18°C.

b) Leveduras

As cepas de leveduras foram multiplicadas em meio de contagem padrão (PC) (%m/v em água destilada) 0,5% triptona; 0,25% extrato de levedura e 0,1% glicose, por 24 h a 30°C. Os meios enriquecidos em células foram transferidos para criotubos de 1,5 mL esterilizados contendo glicerina na proporção 1:1 e conservados a -18°C. As culturas foram também estocadas em ágar inclinado com camada de óleo mineral (Nujol).

c) Bactérias

As bactérias foram multiplicadas em meio Luria Bertani (LB) (%m/v em água destilada; 1,0% triptona; 0,5% cloreto de sódio; 0,5% extrato de levedura) por 24 h a 30°C. Após o crescimento foram realizados os mesmos procedimentos de estocagem utilizados para as leveduras.

3.3.1.3 Seleção dos Microrganismos

a) Meio sólido (placas)

A primeira etapa de seleção das cepas isoladas de fungos filamentosos foi realizada através da análise em placa para detecção de lipase hidrolítica em um meio contendo tributirina, substrato

hidrolisável que proporciona a formação de halos transparentes ao redor das colônias produtoras de enzimas hidrolíticas (Colen et al., 2006; Ko et al., 2005; Kouker e Jaeger, 1987).

O meio de cultivo em placa de Petri usado para seleção de fungos filamentosos produtores de lipases hidrolíticas era constituído de (% m/v em água destilada): peptona 0,5%; extrato de levedura 0,3%; tributirina 0,1%; ágar 2%, pH 6 (Freire, 1996). Os microrganismos foram incubados a 30°C por sete dias, sendo que o raio total (R), que consiste no raio do halo a partir do centro da colônia, e o raio da colônia (r) foram mensurados a partir do terceiro dia de incubação. De acordo com as medidas obtidas, quantificou-se o potencial produtivo de lipase capaz de hidrolisar a tributirina através da capacidade de formação do halo pela colônia inoculada (halo hidrólise = R-r).

b) Fermentação em Estado Sólido (FES)

Como segunda etapa da seleção, as cepas isoladas foram inoculadas em farelo de soja, baseando-se nas condições estabelecidas por Vargas et al. (2008). Após a fermentação avaliou-se a atividade hidrolítica no extrato aquoso bruto e a atividade de esterificação no extrato bruto liofilizado.

Preparo do Inóculo de Fungos

O meio para produção do inóculo dos fungos isolados constituiu-se do mesmo meio utilizado para o isolamento. Frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio esterilizado foram inoculados com 0,5 mL de suspensão de esporos obtida a partir de estoques, sendo então incubados por sete dias a 30°C. A coleta dos esporos foi realizada adicionando-se 10 mL de solução aquosa de Tween 80 (0,1% v/v) e pérolas de vidro estéreis ao frasco para uma melhor remoção dos esporos.

A suspensão resultante, quando não utilizada de imediato, era armazenada a 4°C, por um tempo máximo de 15 dias. Este procedimento foi adotado, pois se observou que se utilizado dentro deste prazo, a idade do inóculo não afetava o andamento da fermentação. Para contagem dos esporos, 1 mL da suspensão era retirado assepticamente e diluído de 10 a 1000 vezes em solução aquosa estéril de Tween 80 (0,1% v/v). A suspensão resultante foi transferida para câmara de Neubauer (Prolab) para contagem dos esporos. A concentração da suspensão foi ajustada para se alcançar 10^8 esporos/g de substrato seco (Freire, 1996).

Preparo do Inóculo de Bactérias e Leveduras

O meio para o inóculo das bactérias e leveduras isoladas consistiu de meio PC (%m/v em água destilada 0,5% triptona; 0,1% glicose; 0,25% extrato de levedura). O pré-inóculo foi preparado em tubos de ensaio contendo 9 mL de meio estéril, inoculados com 1 mL de suspensão das referidas cepas e incubados por 12 h a 30°C. Frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de meio estéril foram inoculados com 10 mL de pré-inóculo, sendo então incubados por mais 12 h em agitador orbital (Marconi MA410) a 30°C e 150 rpm. O caldo obtido era então utilizado como inóculo do farelo de soja. A densidade ótica da suspensão celular foi determinada a 650 nm, após centrifugação (12100xg / 3min) e lavagem com solução salina para retirada do meio de fermentação.

Obtenção de Substrato-Suporte

O substrato-suporte utilizado no processo fermentativo para seleção e produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES) foi o farelo de soja, obtido em uma indústria de óleo de soja local (Olfar, Erechim, RS). O farelo de soja consiste no resíduo da extração do óleo de soja, obtido após a prensagem dos grãos e extração com solvente. A caracterização do farelo foi realizada determinando-se a granulometria, umidade, nitrogênio (NKT) e gordura conforme descrição no item 3.3.11. A análise da umidade antecedia cada etapa experimental de fermentações buscando a padronização do conteúdo deste parâmetro no meio de fermentação.

Após a caracterização da granulometria do farelo de soja (entre 0,25 e 2 mm, ou Tyler 9-60), foi possível determinar qual faixa seria utilizada nos ensaios experimentais de fermentação, decidindo-se pela maior fração obtida (entre 1 e 2 mm).

Processo Operacional para Fermentação em Estado Sólido (FES)

O farelo classificado foi utilizado nas fermentações conduzidas por 48 h em béqueres de polipropileno de 600 mL tampados com manta acrílica hidrofóbica (Figura 3.1), contendo 10 g de farelo de soja seco com umidade ajustada para 55% com água destilada. Após esterilização (121°C, 15 min) os béqueres foram inoculados e incubados em câmara climatizada (Tecnal TE-410). Para a inoculação de fungos utilizou-se 2,5 mL de inóculo com concentração de esporos ajustada para se obter 10^8 esporos/g de farelo seco, incubando-se a 27°C.



Figura 3.1 - Béqueres utilizados para a FES.

As condições utilizadas como ponto de partida para a seleção de cepas produtoras de lipase foram definidas em pesquisas anteriores realizadas no Laboratório de Biotecnologia da URI-Campus de Erechim (Kempka et al., 2008; Vargas et al., 2008; Di Luccio et al., 2004). Para as bactérias e leveduras, a quantidade de água necessária para padronização do conteúdo de umidade do farelo de soja para fermentação (55%) foi adicionada em forma de inóculo diretamente ao farelo bruto.

c) Processo de Extração da enzima

O processo de extração foi realizado em Erlenmeyeres de 250 mL, onde ao meio fermentado era adicionado tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 na razão 1:4 (10 g de farelo fermentado para 40 mL de tampão). Estes frascos foram incubados por 30 min a 35°C e 160 rpm em agitador orbital. Após a incubação, as amostras foram filtradas, utilizando-se tecido de nylon e pressão manual obtendo-se o extrato enzimático bruto (Vargas et al., 2008).

A atividade enzimática foi determinada segundo procedimento descrito nos itens 3.3.3 e 3.3.4. Todas as determinações foram realizadas em duplicata. Cabe ressaltar que a determinação da atividade de esterificação deve ocorrer em sistema com baixo conteúdo de umidade. Assim, foi necessário realizar a secagem do extrato aquoso obtido após o processo de extração da enzima da matriz sólida. Para tanto, foi empregado o processo de liofilização, descrito no item 3.3.4.

3.3.2 Identificação dos microrganismos

Os microrganismos selecionados como potenciais produtores de lipases hidrolíticas através do sistema de FES foram algumas cepas de fungos filamentosos. Dentre os 96 fungos filamentosos isolados, 30 foram selecionados, de acordo com a atividade hidrolítica. Estas cepas foram identificadas quanto ao gênero, através da chave de identificação de gêneros de Barnett & Hunter (1986).

Técnica de microcultivo

Para desenvolvimento da técnica de microcultivo os fungos foram semeados em cubos de ágar sobre uma lâmina e então recoberto com uma lamínula esterilizada dentro de uma placa de Petri úmida, como demonstrado na Figura 3.2 (Ribeiro & Soares, 1993). A placa foi incubada por cinco dias a 25°C.

A lamínula com as hifas aderidas foi retirada e corada com azul de lactofenol-algodão (“Cotton Blue”), para melhorar a visualização das características do fungo cultivado. O mesmo procedimento foi adotado para visualizar esporos e hifas possivelmente aderidos à lâmina.

Após a secagem, as lâminas foram visualizadas em microscópio para identificação das espécies de fungos, fundamentada na morfologia macroscópica das colônias e no estudo dos órgãos vegetativos e de frutificação do fungo, seguindo a chave de identificação de gêneros de Barnett e Hunter (1986).

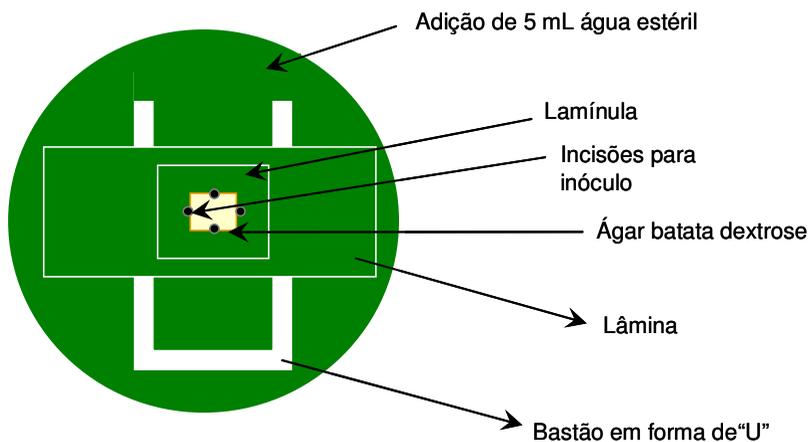


Figura 3. 2 - Esquema demonstrativo da técnica de microcultivo para fungos filamentosos.

3.3.3 Determinação da atividade hidrolítica

3.3.3.1 Método Titulométrico

Para a dosagem da atividade de hidrólise dos extratos enzimáticos lipolíticos, utilizou-se uma emulsão de óleo de oliva 10 % (m/v) e goma arábica 5 % (m/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. A 18 mL desta emulsão foram adicionados 2 mL da amostra do extrato bruto aquoso. Após incubação por 15 minutos a 37 °C com agitação de 160 rpm, a reação era interrompida através da adição de uma solução de acetona-etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados durante a reação eram então titulados até pH 11 com solução 0,05 M de NaOH em titulador automático. Os brancos reacionais foram preparados adicionando-se a solução de acetona-etanol e a amostra logo em seguida foi titulada. No caso da enzima pré-purificada liofilizada a dosagem da atividade de hidrólise foi realizada adicionando-se 0,1 g de amostra aos 20mL de meio reacional.

O cálculo da atividade hidrolítica foi realizado de acordo com a Equação 3.1. Uma unidade de atividade hidrolítica é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido graxo por minuto nas condições de reação (Cavalcanti et al., 2005).

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

Onde:

AH = atividade hidrolítica (U/g);

V_a = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após a reação (mL);

V_b = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo zero- branco (mL);

M = molaridade da solução de NaOH (mmol/mL);

t = tempo de reação (min);

V_c = volume do extrato enzimático usado na reação (mL);

V_d = volume do solvente usado na extração (mL);

m = massa de sólido usado para extração (seco ou úmido).

3.3.3.1 Método espectrofotométrico

Para a determinação ou avaliação da atividade de hidrólise dos extratos enzimáticos pré-purificados utilizou-se o método espectrofotométrico. A atividade é avaliada através da reação de hidrólise catalisada pela lipase de ésteres de *p*-nitrofenil, com a formação do produto cromóforo *p*-nitrofenol. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de solução enzimática a 0,25 mL do substrato *p*-nitrofenil laurato 2,5mM com acetonitrila: DMSO (1:1) e 2,2 mL de tampão fosfato de sódio 50mM pH 7, a 30°C (Godoy et al., 2009). A reação foi acompanhada em espectrofotômetro em 410 nm no modo cinética. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1,0 µmol de *p*-nitrofenol por minuto nas condições de ensaio.

3.3.4 Determinação da atividade de esterificação

A atividade de esterificação do extrato enzimático bruto liofilizado foi quantificada através da reação de esterificação do ácido oléico e *n*-propanol (razão molar 1:1) (Langone et al., 1999; Bernardes et al., 2007, modificado). A reação foi conduzida a 40°C, 160 rpm por 40 min. Esta foi iniciada pela adição do extrato liofilizado (0,1 g) ao meio reacional, em frascos de vidro com tampa mantidos em agitador orbital. Aliquotas de 150 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata no início e ao final da reação. A cada amostra foram adicionados 20 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para paralisar a reação e para extração do ácido oléico.

A quantidade de ácido consumida foi determinada por titulação com NaOH 0,01 M. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio. A atividade enzimática foi calculada utilizando a Equação 3.2.

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000 \times V_f}{t \cdot M_{EL} \times V_c} \quad (3.2)$$

Onde:

AE = atividade de esterificação (U/g);

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

V_b = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo 0 (mL);

M = molaridade da solução de NaOH;

V_f = volume final de meio reacional (mL);

t = tempo (min);

M_{EL} = massa de torta seca (g);

V_c = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

Liofilização do extrato enzimático

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

A umidade residual dos extratos liofilizados foi determinada em sistema Karl Fisher, sendo que o teor de água dos extratos enzimáticos não ultrapassou 12%. As amostras secas foram acondicionadas em frascos de vidro, lacrados, codificados e vedados com Parafilm[®], sendo armazenadas sob refrigeração (4°C). Estes extratos liofilizados foram utilizados na reação em meio orgânico, conforme descrito no item 3.3.4.

3.3.5 Atividade proteásica

Em tubos de polipropileno de 1,5 mL foram adicionados 0,5 mL de amostra e 0,5 mL de solução de azocaseína¹ 0,5% (m/v) preparada em tampão acetato 50 mM pH 5,0. Os tubos foram então incubados durante 15 min (Vargas et al., 2008) a 37°C . Após o período de incubação, a reação enzimática foi interrompida adicionando-se 0,5 mL de solução de ácido tricloro-acético (TCA) 10% (m/v), em banho de gelo. Os tubos com a mistura foram centrifugados a $12.900 \times g$ por 20 min. Retirava-se então 1 mL do sobrenadante, ao qual foi adicionado 1 mL de solução de hidróxido de potássio 5 M. Fazia-se então a determinação da absorbância da solução por espectrofotometria em 428 nm. O branco das reações era preparado adicionando-se a amostra após

¹ Detalhes sobre o preparo desta solução se encontram no Anexo I.

a adição do TCA. O branco do aparelho foi preparado substituindo-se o volume de amostra por tampão acetato 50 mM pH 5,0. Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença unitária de absorbância por minuto de reação entre o branco reacional e a amostra nas condições de ensaio, determinada através da Equação 3.3 (Charney e Tomarelli, 1947).

$$AP = \frac{(Abs_a \times f_a - Abs_b \times f_b)}{t \times V_a} \quad (3.3)$$

Onde:

AP = atividade proteásica (U/mL);

Abs_a = leitura de absorbância da amostra;

Abs_b = leitura de absorbância do branco;

f = fator de diluição;

t = tempo de reação (min);

V_a = volume de amostra (mL).

3.3.6 Determinação de proteína

A determinação de proteínas foi realizada de acordo com método proposto por Bradford (1976), utilizando curva padrão de albumina de soro bovino.

As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm, após 2 min da adição de 0,1 mL de amostra a 5 mL do reagente de Bradford.

3.3.7 Estudo da suplementação do farelo de soja

A etapa de seleção dos microrganismos produtores de lipases com atividade hidrolítica resultou em algumas cepas promissoras, dentre as quais foram selecionadas as dos fungos *Penicillium* 58F e 74F, isoladas de farelo de soja e de requeijão. A seleção das cepas foi realizada levando-se em consideração os resultados obtidos ao correlacionar os resultados obtidos no *screening* fermentativo com as características genéticas dos microrganismos através de técnicas de biologia molecular – RAPD, visando identificar possíveis duplicações de cepas entre os microrganismos selecionados como bons produtores

(Griebeler et al., 2009).

Os suplementos testados foram o óleo de soja, melaço de cana de açúcar (ME, usina Ester, SP), água de maceração de milho (AMM, Refinações de Milho do Brasil), hidrolisado de levedura de cerveja (HL, ProdexLac SD, Biospringer do Brasil) e uréia. Os resíduos de indústrias melaço (ME), água de maceração de milho (AMM), hidrolisado de levedura (HL), podem ser consideradas fontes suplementares complexas contendo macro e micronutrientes. Fermentações em farelo de soja puro (FP) foram sempre conduzidas paralelamente, considerando-as como meio controle.

Para a realização das suplementações foram preparadas emulsões com água deionizada e 1% do respectivo suplemento homogeneizando-se com mixer por 3 minutos, levando em consideração a relação C/N do farelo de soja bruto como padrão (6,11). Para a avaliação da uréia como suplemento, viabilizando a comparação com os demais suplementos a uma mesma relação C/N, foi adicionado óleo de soja até a obtenção de relação C/N 6,11.

O volume de emulsão adicionado ao farelo foi padronizado em 3 mL. O ajuste de umidade foi realizado com água destilada estéril, levando-se em consideração a quantidade de água presente no inóculo e a umidade natural do farelo de soja bruto. As emulsões foram adicionadas por gotejamento manual com auxílio de pipetador, de forma que toda a área do farelo fosse recoberta, melhorando assim a homogeneidade do meio. A umidade do meio foi ajustada a 55% (m/m). Os béqueres foram então fechados com manta acrílica e autoclavados a 121°C por 15 min.

Após a esterilização, procedeu-se a inoculação do farelo de soja com uma suspensão de esporos dos microrganismos selecionados como potenciais produtores de lipase com atividade de hidrólise, padronizando-se a suspensão em 10^8 esporos/(g farelo seco). Os béqueres foram incubados em câmara a 27°C, com injeção de ar úmido, de forma a manter a umidade relativa do ar no interior da câmara maior que 90%, acompanhada com termo higrômetro. As condições experimentais da fermentação utilizada para o *screening* foram definidas por Vargas et al. (2008).

As fermentações desenvolvidas para avaliação do comportamento cinético da suplementação do farelo de soja na produção de lipase com atividade hidrolítica foram realizadas em triplicata de experimentos, com retirada de amostras destrutivas do material fermentado nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas de fermentação na mesma câmara de incubação. A variável de resposta foi a atividade hidrolítica determinada

como descrito no item 3.3.4 (a), utilizando diferentes pH, de forma monitorar a produção de lipases distintas. Os pH avaliados para determinação da atividade hidrolítica foram pH 4,0 (tampão acetato de sódio 100 mM); 7,0 (tampão fosfato de sódio 100 mM) e 9,0 (tampão Tris-HCl 100 mM).

3.3.7.1 Avaliação do pH do farelo de soja fermentado

Foi pesado 0,5g de farelo de soja fermentado em tubo de ensaio onde adicionou-se 5mL de água destilada. O conteúdo do tubo foi homogeneizado e então realizada a medida pontual do pH através da inserção do sensor.

3.3.8 Estudo da produção de lipase hidrolítica

O estudo apresentado a seguir valeu-se da técnica de planejamento de experimentos. Foi realizado primeiramente um planejamento do tipo Plackett-Burman para *screening* das variáveis que poderiam apresentar influência sobre a produção de lipase, descritas na Tabela 3.1. Os ensaios experimentais foram realizados com a cepa *Penicillium* 58F, selecionada de acordo com os resultados obtidos na etapa de suplementação do farelo de soja, (item 3.3.7), sendo escolhida a suplementação com uréia acrescida de óleo de soja (UROS) (C/N 6,11). As faixas de granulometria do farelo foram definidas de acordo com as maiores frações classificadas, 1-2 mm (Tyler 9-16), 0,50-1 mm (Tyler 16-32) e 0,25-0,50 mm (Tyler (32-60).

Todas as análises e ensaios foram realizados em duplicata sendo o ponto central do planejamento realizado em triplicata. A quantificação da atividade hidrolítica foi também avaliada em diferentes valores de pH (4, 7 e 9), conforme o método titulométrico descrito no item 3.3.3(a).

Após a análise dos resultados do primeiro planejamento experimental (PB12), usando o pacote Statistica 5.1 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), um segundo planejamento experimental (completo) foi realizado. Os coeficientes de regressão consideraram significância estatística de 95%, indicando os níveis das variáveis que resultaram na condição ótima de extração.

Neste planejamento manteve-se as variáveis nos respectivos níveis, fixas, temperatura (-1), granulometria (1), concentração de esporos (1). Os níveis e os referidos fatores (umidade e concentração do

suplemento) que foram investigados no segundo planejamento são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.1 - Faixa dos fatores investigados no primeiro planejamento experimental PB12 (Plackett-Burman)

<i>Níveis</i>	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>
Temperatura (°C)	20	27	34
Umidade (%)	35	55	75
Granulometria (Tyler)	60	32	16
Concentração esporos (esporos/g)	1×10^7	$1,05 \times 10^8$	2×10^8
Suplemento (UROS)* (%)	1	5,5	10

* concentrações baseadas no teor de uréia

Tabela 3.2 - Faixa dos fatores investigados no segundo planejamento experimental

<i>Níveis</i>	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>
Umidade (%)	55	65	75
Suplemento (UROS)* (%)	0,6	1,8	3

* concentrações baseadas no teor de uréia

A análise do segundo planejamento experimental indicou a necessidade de um terceiro planejamento experimental, para otimização da produção de lipase, cujos níveis são apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Faixa dos fatores investigados no terceiro planejamento experimental

<i>Níveis</i>	<i>-1,41</i>	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>+1,41</i>
Umidade (%)	61	65	75	85	89
Suplemento (UROS)(%)	0,10	0,24	0,6	0,95	1,1

* concentrações baseadas no teor de uréia

3.3.8.1 Estudo da variação C/N na produção de lipase hidrolítica

De acordo com os resultados obtidos com a realização de

planejamentos experimentais, a condição para maximização da produção de lipase com o fungo *Penicillium* 58F em farelo de soja foi encontrada.

Após encontrar a condição que maximizou a produção de lipase pelo fungo 58F, (UROS 0,6% (m/m)), avaliou-se o efeito da relação C/N. As concentrações de uréia e óleo de soja nas diferentes relações C/N estudadas são descritas na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Avaliação da produção de lipase com atividade hidrolítica em farelo de soja suplementado com uréia acrescida a óleo de soja em diferentes relações C/N.

<i>Relação C/N</i>	<i>Óleo de soja(%)</i>	<i>Uréia (%)</i>
2,00	2,0	41,2
6,11	2,0	0,6
10,22	39,5	0,6

3.3.9 Caracterização parcial da lipase hidrolítica

3.3.9.1 Extração da enzima da matriz de fermentação

A verificação da influência das variáveis do processo de extração da enzima do farelo fermentado foi realizada por um planejamento experimental completo 2^4 apresentado na Tabela 3.5. Esta técnica possibilita a avaliação dos efeitos isolados e as interações entre as variáveis de extração sobre a quantidade de enzima extraída. As variáveis investigadas foram, pH do solvente (5,5-8,5), temperatura (25-49°C), agitação (50-150 rpm) e razão sólido:líquido (1:20-5:20).

O solvente (tampão fosfato de sódio), agitação (150 rpm) e faixa de pH e temperatura foram selecionados com base em estudos da extração de algumas enzimas, como xilanases (Heck et al., 2005), pectinases (Castilho et al., 2000; Castilho et al., 1999), inulinases (Mazutti et al., 2006) e lipases (Di Luccio et al., 2004; Vargas et al., 2008; Kempka et al., 2008).

O processo de extração foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 250 mL, em agitador orbital durante 30 min (Di Luccio et al., 2004; Vargas et al., 2008; Kempka et al., 2008). Cada condição experimental proposta no planejamento foi realizada em triplicata. O extrato era filtrado e a atividade lipásica do sobrenadante (extrato enzimático bruto)

determinada em duplicatas em pH neutro. O mesmo lote de farelo foi utilizado em todos os ensaios.

Tabela 3.5 - Faixa das variáveis investigadas no planejamento completo 2⁴ para avaliação do processo de extração da enzima contida na matriz sólida.

<i>Níveis</i>	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>
Temperatura (°C)	25	37	49
Agitação (rpm)	50	100	150
pH	5,5	7,0	8,5
Razão sólido:líquido	5:20	3:20	1:20

A análise estatística dos resultados obtidos com 30 min de extração foi realizada considerando-se os coeficientes de regressão com significância estatística de 95%, indicando os níveis das variáveis que resultaram na condição ótima de extração. A influência dos parâmetros do processo de extração foi analisada pelo planejamento rotacional composto central (CCRD). Após encontrar a condição que maximizou a extração da enzima da matriz sólida, realizou-se o estudo da extração nos tempos 0, 15, 30 e 45 minutos.

3.3.9.2 Pré-purificação da lipase hidrolítica

a) Precipitação com sulfato de amônio

De acordo com metodologia desenvolvida por Menoncin et al. (2008), o ensaio de precipitação foi realizado com a adição de 50 mL do extrato enzimático bruto centrifugado (4°C; 4000xg por 10 min) em um béquer de 200 mL, ao qual foi acrescentado sulfato de amônio (Vetec) até a concentração de 60% de condição de saturação. O béquer contendo a referida mistura foi mantido a 4°C em banho de gelo, com agitação constante, mantendo o pH em 7,0 com adição de NaOH 0,5 M.

O extrato enzimático acrescido do sal foi transferido para tubos de centrifuga e mantido a (-10°C) durante 5 h. Transcorrido este tempo, o mesmo foi centrifugado (4°C; 5400xg durante 30 minutos), possibilitando a separação da fração protéica. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso até volume inicial (50mL) com tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 (Menoncin et al., 2008; Shu et al., 2006).

As determinações da atividade hidrolítica e a concentração de proteína foram realizadas via método titulométrico e de Bradford, respectivamente.

b) Diafiltração

As amostras de extrato enzimático precipitado ressuspenso foram submetidas ao processo de diafiltração para a remoção do sulfato de amônio, proveniente da etapa de precipitação. Assim, 50 mL do referido extrato foram transferidos para a célula de ultrafiltração de 200 mL, contendo membrana de 10 kDa (Milipore) e diafiltrado utilizando dois volumes de 50 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 (Zeman and Andrew, 1996). O sistema foi operado a 4°C para minimizar as perdas de atividade enzimática.

O extrato enzimático pré-purificado foi submetido ao processo de liofilização (item 3.3.4.1) durante 12 h. A amostra foi armazenada em frasco previamente dessecado e vedado, para posterior caracterização.

3.3.9.3 Determinação da temperatura e pH ótimo do extrato enzimático

A determinação do pH ótimo da reação enzimática foi realizada através do preparo das emulsões contendo substrato para dosagem da atividade hidrolítica com soluções tampão em diferentes valores de pH: 3, 4 e 5 (tampão acetato de sódio 100 mM); 6, 7 e 8 (tampão fosfato de sódio 100 mM), 9 (tampão Tris-HCl 100 mM) e 10 (tampão glicina-NaOH 100 mM). No caso da avaliação da temperatura ótima da reação enzimática, a quantificação da atividade (item 3.3.3(a)) foi realizada através da incubação da reação em diferentes temperaturas (20 a 47°C) por 15 min.

As dosagens das atividades foram realizadas em triplicata de reação, sendo a quantificação (item 3.3.3(a)) realizada a 37°C por 15 minutos adicionando-se ao meio reacional 2 mL de amostra do extrato bruto ou 0,1 g do extrato concentrado liofilizado.

3.3.9.4 Estabilidade

a) pH

Para a determinação da estabilidade em função do pH, o extrato concentrado liofilizado (0,2 g) foi incubado em 10 mL de diferentes tampões com valores de pH variados, dentre estes, pH 3, 4 e 5 (tampão

acetato de sódio 250mM); 6, 7 e 8 (tampão fosfato de sódio 250mM), 9 (tampão Tris-HCl 250mM) e 10 (tampão glicina-NaOH 250mM). A mistura foi então incubada a 35°C em banho termostático (Nova Ética). Amostras de cada ensaio foram coletadas no início ($t=0$) e após 1 h, para determinação da atividade hidrolítica (3.3.3(a)), que foi determinada na temperatura e pH ótimos definidos para o extrato bruto e concentrado liofilizado.

b) Térmica

A determinação da estabilidade em função da temperatura foi realizada incubando-se o extrato concentrado liofilizado (0,2 g em 10 mL do tampão selecionado (item 3.3.9.4 a)) em diferentes temperaturas (20, 25, 30, 37 e 45°C). Amostras de cada ensaio foram coletadas no tempo inicial ($t=0$) e após 1 h para determinação da atividade hidrolítica (3.3.3(a)), conforme relatado para estabilidade ao pH.

c) Sais de Cálcio (CaCl₂)

De acordo com os resultados obtidos de estabilidade do extrato enzimático pré-purificado foram realizados testes incubando-se o extrato pré-purificado liofilizado a várias concentrações de CaCl₂ (0,1; 0,5; 1%) dissolvido em tampão fosfato de sódio 250mM. Os experimentos foram realizados a temperatura de incubação de 25°C.

Amostras de cada ensaio foram coletadas no tempo inicial ($t=0$) e após 1 h para determinação da atividade hidrolítica (3.3.3(a)) e assim verificar o efeito do cálcio na estabilidade do extrato.

3.3.9.5 Especificidade

a) Triglicerídeos

Os diferentes triglicerídeos que foram utilizados na avaliação da especificidade hidrolítica do extrato concentrado liofilizado foram tributirina (4:0), trioleína (18:1) e tricaprilina (8:0), bem como, o óleo de oliva e de soja (Colen et al., 2006; Bradoo et al., 2002; Wang et al., 1995). Os ensaios foram realizados segundo método titulométrico, descrito no item 3.3.2.1.

b) Ésteres de p-nitrofenol

Os diferentes substratos cromogênicos que foram utilizados na avaliação da especificidade hidrolítica do extrato concentrado liofilizado

foram os ésteres de *p*-nitrofenol: butirato de *p*-nitrofenila (*p*NPB) (4:0); palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) (16:0); estearato de *p*-nitrofenila (*p*NPE) (18:0); laurato de *p*-nitrofenila (*p*NPL) (12:0). Os ensaios foram realizados segundo metodologia descrita no item 3.3.2.1.

3.3.10 Caracterização parcial da lipase com atividade de esterificação

Dentre as 203 cepas microbianas isoladas de diferentes tipos de amostras, 17 cepas demonstram-se viáveis para produção de lipases com atividade de esterificação em ácido oléico e álcool *n*-propílico.

Os extratos enzimáticos liofilizados, produzidos através de fermentação com os 17 microrganismos, previamente selecionados nas mesmas condições (item 3.3.1), foram caracterizados frente a diferentes álcoois e ácidos graxos.

3.3.10.1 Especificidade do extrato enzimático em diferentes álcoois

A seletividade do extrato enzimático bruto liofilizado foi avaliada em diferentes álcoois (metanol, etanol, *n*-propanol e *n*-butanol) através da determinação da atividade de esterificação. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o procedimento padrão, descrito no item 3.3.4.

3.3.10.2 Especificidade do extrato enzimático em diferentes ácidos graxos

A seletividade da enzima do extrato enzimático bruto liofilizado foi avaliada em ácido láurico (12:0) e oleico (18:0) (Bradoo et al., 2002). A atividade enzimática foi determinada de acordo com o procedimento padrão, descrito no item 3.3.3.

3.3.11 Composição físico-química do farelo de soja

3.3.11.1 Classificação granulométrica

O farelo de soja foi classificado entre 0,25 e 2 mm, ou Tyler 9-60, tornando-se possível verificar qual a maior fração obtida, para ser

utilizada nos ensaios experimentais de fermentação (entre 1 e 2 mm). O farelo classificado foi armazenado a -18°C até o momento da utilização.

3.3.11.2 Determinação do teor de óleos e graxas (O&G)

O teor de óleos e graxas do farelo de soja foi determinado por extração em Soxhlet pelo princípio da extração contínua a quente, utilizando n-hexano como solvente, segundo procedimento padrão (Brasil, 2005). O papel de filtro contendo 3 g de amostra foi empacotado e colocado em cartucho de extração previamente seco em estufa a 105°C por 15 min. O cartucho foi colocado no extrator e iniciava-se a extração com n-hexano por 1,5 h em sistema de extração repetida (Marconi). O solvente foi recuperado e o copo contendo as gorduras extraídas foi seco em estufa a 105°C por 1,5 h, resfriado em dessecador por 30 min e, então, pesado. O teor de óleos e graxas foi calculado através da Equação 3.6.

$$O \& G = \frac{(B - A) \times 1000}{C} \quad (3.4)$$

Onde:

O&G= Teor de óleos e graxas (mg/g);

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

A= Massa do balão vazio seco (mg);

C= Massa do farelo de soja (g).

3.3.11.2 Determinação de nitrogênio Kjeldahl total (NKT)

A determinação do teor de Nitrogênio Kjeldahl Total (NKT) foi feita por método padrão (Brasil, 2005). A amostra (1 g) foi digerida em meio ácido (12 mL de H_2SO_4 concentrado) na presença de 1 pastilha de 3,5 g sulfato de potássio e 3,5 g selênio durante 4 h. Após neutralização com 40 mL de NaOH (40% m/v), 75 mL de água destilada foram adicionados. A amônia formada foi destilada e absorvida em 25 mL de ácido bórico (4% m/v) sendo, em seguida, titulada com HCl 0,1M. A concentração de nitrogênio foi determinada através da Equação 3.7, sendo que para obtenção do o teor de proteína é necessário multiplicar o valor de NKT encontrado pelo fator 6,25.

$$NKT = \frac{14,01 \times Va \times N}{P \times 10} \quad (3.5)$$

Onde:

NKT= (%) Nitrogênio Kjeldahl total;

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

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

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

3.3.11.3 Umidade

Foi pesado 0,5g da amostra em cápsula de porcelana, previamente seca em estufa a 105°C, até massa constante. O material contendo a amostra foi aquecido em estufa 105°C por 3 h, resfriado e pesado; repetido-se a operação de aquecimento, com duração de meia hora, até obtenção de massa constante.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 Isolamento de microrganismos produtores de lipases

Neste estudo foram isolados microrganismos provenientes de diversas fontes representativas quanto à probabilidade do desenvolvimento de microrganismos produtores de lipases extracelulares. Os 203 microrganismos isolados foram classificados como sendo 96 fungos filamentosos, 104 leveduras e 3 bactérias. Estas últimas embora tenham crescido como contaminantes nos meios de isolamento foram testadas na etapa de seleção.

Dentre os microrganismos isolados o maior número de fungos filamentosos e leveduras se deve ao fato de que o meio utilizado nesta etapa foi seletivo a estas culturas, considerando que fungos e leveduras são indicados por apresentarem algumas vantagens em sistemas de FES, como ao cultivo em suportes naturais sólidos (Holker et al., 2004). Assim sendo, o objetivo deste estudo foi selecionar fungos filamentosos e leveduras hábeis à produção de lipase microbiana em FES.

4.2 Seleção de microrganismos produtores de lipases com atividade hidrolítica

Foram utilizados dois métodos para seleção dos microrganismos produtores de lipases, vislumbrando a possibilidade de uma boa varredura entre as cepas isoladas, objetivando a seleção de microrganismos com potencial relevante de produzir lipases hidrolíticas em sistema de FES. A seleção em placas com meio sólido contendo tributirina é um método rápido e de fácil visualização (Kim et al., 2007). Contudo, a seleção na própria matriz da fermentação, neste caso o farelo de soja, torna-se interessante considerando a adaptação do microrganismos na matriz de fermentação.

4.2.1 Seleção de fungos em meio sólido

O uso de meios sólidos suplementados com triglicerídeos emulsificados é uma metodologia utilizada como padrão na seleção de

microrganismos produtores de lipases com atividade de hidrólise (Damaso et al., 2008; Takaç e Marul, 2008; Ko et al., 2005; Cardenas et al., 2001; Wang, et al., 1995) bem como de síntese de ésteres (Sandoval e Marty, 2007).

Através da seleção dos microrganismos em placas, com meio sólido contendo tributirina, identificaram-se 23 fungos que geraram halo de hidrólise, após o terceiro dia de incubação, visualizado conforme exemplo apresentado na Figura 4.1. Os microrganismos foram isolados de amostras provenientes de solo (53F, 84F, 18F, 21F, 57F, 56F, 34F, 60F, 55F), derivados lácteos (62F, 61F, 46F, 64F, 74F, 54F, 72F, 24F, 30F), manteiga (52F), azeite de oliva (59F), carne (130F), extrato de tomate (10F) e farelo de soja (58F, 79F).

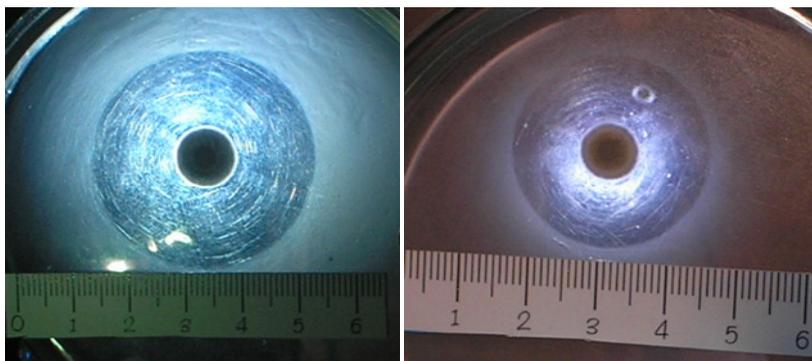


Figura 4.1 - Exemplo de um halo de hidrólise em meio sólido contendo tributirina.

A Figura 4.2 apresenta a avaliação do tamanho do halo produzido pela hidrólise da tributirina de 3 a 5 dias de incubação por lipases produzidas pelos fungos isolados de amostras de solo (a), de produtos lácteos (b) e de amostras diversas (c). A análise dos resultados apresentados na Figura 4.2 (a) indica o fungo 21F como o produtor de lipase com capacidade relevante de hidrólise da tributirina comparado com os demais fungos isolados de amostras de solo. Para este microrganismo, a medida do halo foi máxima entre o quarto e quinto dia (22,4-26,5 mm), sugerindo a ocorrência da degradação máxima já nos primeiros dias de incubação. A lipase produzida pelo fungo 18F resultou em um diâmetro de halo da hidrólise da tributirina de 18,7 mm já no terceiro dia de incubação, chegando a 22,2 mm do quinto dia, mostrando-se assim também um promissor produtor de lipase com atividade hidrolítica.

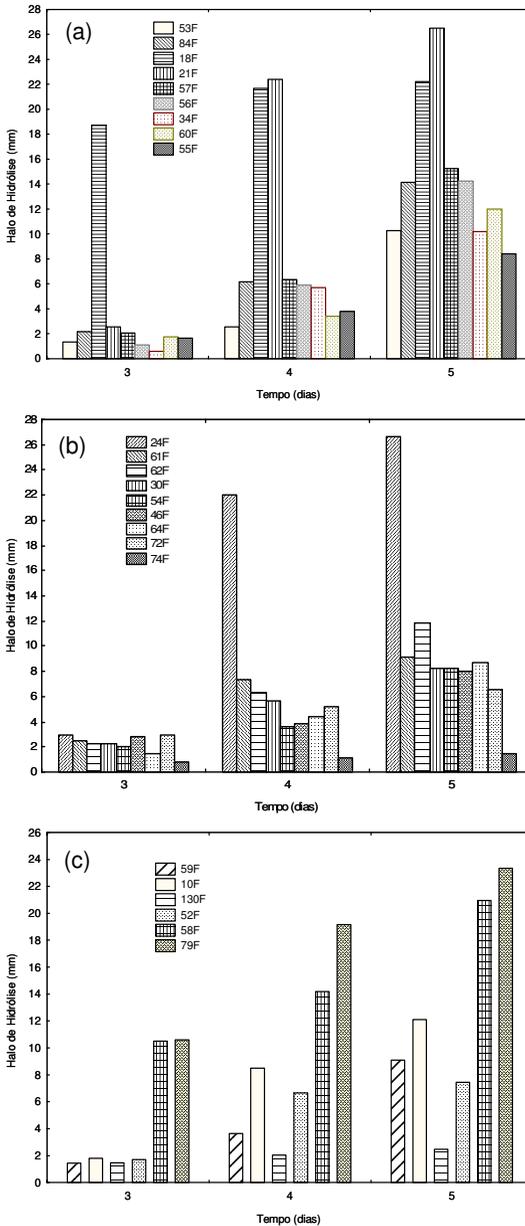


Figura 4.2 - Evolução do halo produzido pela hidrólise da tributirina de produtores de lipase isolados de amostras de solo (a), de produtos lácteos (b) e amostras diversas (c).

A Figura 4.2 (b) apresenta a avaliação da evolução do halo produzido pela hidrólise da tributirina no meio sólido, por lipases produzidas por fungos isolados de amostras provenientes de produtos lácteos. O fungo 24F foi identificado como o mais promissor em termos de hidrólise da tributirina, apresentando diâmetro de halo máximo de 26,7 mm no quinto dia de incubação. Na Figura 4.2 (c) pode-se visualizar que os fungos 79F e 58F, provenientes de amostras de farelo de soja em decomposição, foram os mais promissores produtores de lipases.

Os fungos selecionados com bom potencial para produção de lipases em ordem decrescente são descritos abaixo:

21F > 24F > 79F > 18F > 58F

Contudo, dentre as 96 cepas, pode-se observar que 24 apresentaram algum potencial de produção de lipases com capacidade de hidrolisar a tributirina. Os halos de hidrólise formados variaram de 1,4 a 26,7 mm em pH 6. Colen et al. (2006) apresentaram a seleção de fungos originários de amostras de solo como potenciais produtores de lipase alcalina, apresentando diâmetros de halo ente 12 e 14 mm, após 18 horas de incubação. Os cinco fungos selecionados no presente trabalho necessitam de estudos sobre o comportamento em meios específicos para produção de lipase de interesse, possibilitando assim a seleção para aplicação na produção de lipase por fermentação em estado sólido.

4.2.2 Seleção por fermentação em estado sólido

A maioria dos trabalhos de seleção de microrganismos produtores de lipase utiliza ágar à base de tributirina ou óleos emulsionados. No entanto, alguns trabalhos sugerem a realização da seleção no meio de produção (Kim et al., 2007). Neste caso, devido ao interesse por lipases com potencial de hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa, a FES foi realizada com farelo de soja com os 200 microrganismos isolados. A variável de resposta neste caso foi a dosagem da atividade hidrolítica em óleo de oliva em condição padrão (Vargas et al., 2008). Um exemplo do aspecto do farelo antes e depois da fermentação pode ser visualizado na Figura 4.3 (a) e 4.3 (b), respectivamente, onde é possível observar o crescimento do fungo filamentosos nas partículas do farelo de soja, conferindo-lhe uma aparência esverdeada.

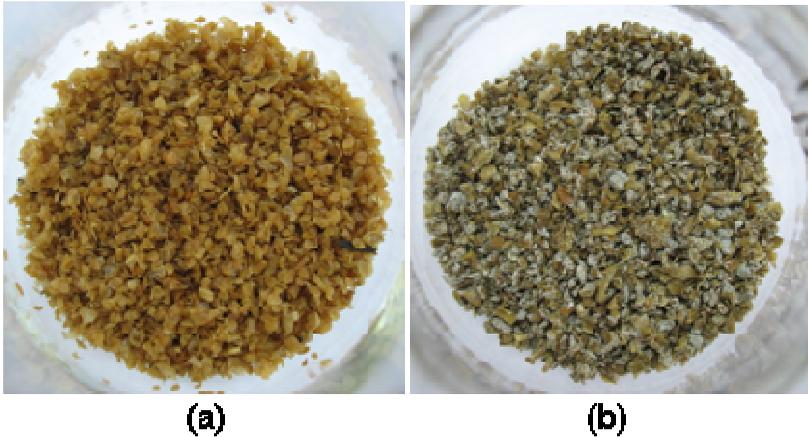


Figura 4.3 - Aparência do farelo de soja antes (a) e após (b) a fermentação.

O estudo da produção de lipase em FES com farelo de soja indicou alguns fungos, sendo os mais ativos os provenientes de amostra de solo (18F e 21F), e carne (130F) apresentados na Figura 4.4 (a) com atividade de 71,91; 48,02 e 78,77 U/g substrato úmido respectivamente. Os fungos isolados de amostra de farelo de soja (79F e 58F), apresentaram atividades de 71,60 e 86,53 U/g substrato úmido, respectivamente (Figura 4.4 (b)). Os fungos 24F e o 74F (Figura 4.4 (c)) merecem destaque, pois apresentaram atividade de hidrólise de 46,63 e 98,52 U/g substrato úmido.

Os resultados revelaram que somente os fungos filamentosos foram selecionados como potenciais produtores de lipases hidrolíticas. O sistema de fermentação em estado sólido apresenta características que viabilizam o desenvolvimento de cepas fúngicas (Holker et al., 2004), sendo estas ressaltadas através do crescimento nos últimos anos do número de estudos envolvendo fungos associados a diferentes matrizes sólidas, para produção de lipases hidrolíticas. Destaca-se a utilização do farelo de soja como suplemento-suporte para a FES usando o fungo *Penicillium simplicissimum* (Vargas et al., 2008; Di Luccio et al., 2004) *Penicillium verrucosum* (Kempka et al., 2008) e *Penicillium* sp. (Wolski et al., 2009b) para produção de lipase hidrolítica.

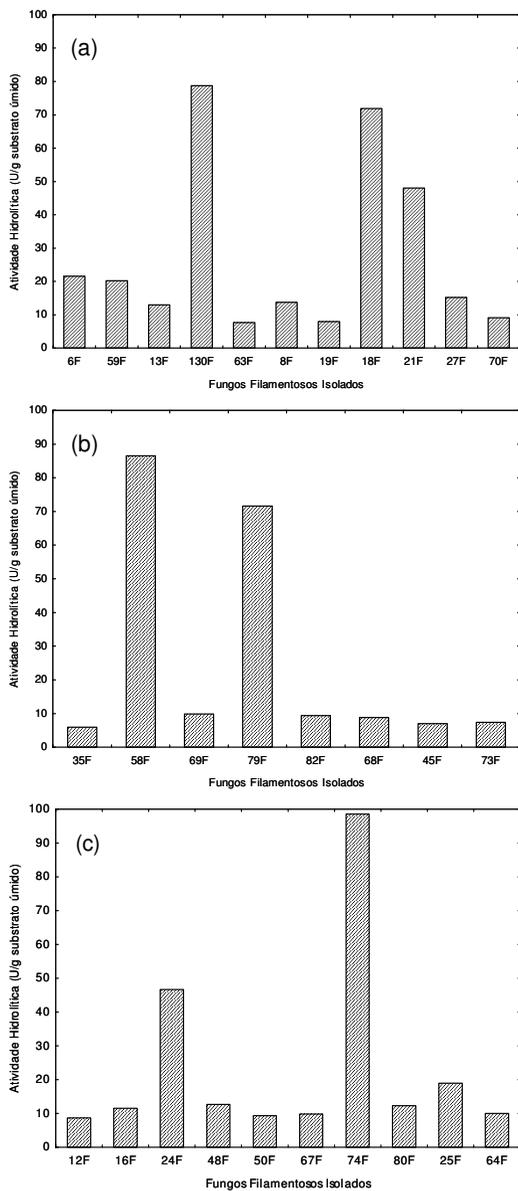


Figura 4.4 - Avaliação da atividade de hidrólise do óleo de oliva por diferentes lipases produzidas em fermentação em estado sólido por microrganismos isolados de solo e amostras diversas (a), de amostras de farelo de soja (b) e de amostras de produtos lácteos (c).

É importante observar que alguns dos microrganismos que apresentaram halo de hidrólise não apresentaram atividade hidrolítica quando inoculados em farelo de soja (Griebeler et al., 2009). Os menores halos produzidos foram encontrados nas cepas 130F e 74F. Contudo, a cepa 74F apresentou a maior atividade em farelo de soja dentre os microrganismos selecionados através deste método. Este fato ressalta a importância da comparação entre os métodos de seleção, considerando que a pré-seleção em tributirina não incluiria algumas das cepas mais produtivas encontradas nesta pesquisa para produção de lipase hidrolítica.

Cabe ainda ressaltar que segundo Kim et al. (2007), esterases hidrolisam ésteres com ácidos carboxílicos de cadeia curta (≤ 10 átomos de carbono) e lipases atuam em acilglicerídeos de cadeia longa (≥ 10 átomos de carbono). Desta forma, a discrepância entre os resultados obtidos em tributirina (C4:0) e os obtidos por fermentação no estado sólido pode estar relacionada com a produção de diferentes enzimas com especificidades distintas.

Fojan et al. (2000) apresentam algumas técnicas que podem ser usadas para distinguir lipases de esterases, como a comparação da sequência de aminoácidos e avaliação da estrutura tridimensional da proteína. A conformação do substrato pode indicar o tipo de hidrolase produzida, considerando que as lipases apresentam alta atividade em substratos agregados e as esterases preferencialmente em substratos solúveis.

A Tabela 4.1 apresenta a avaliação comparativa entre os resultados obtidos em tributirina com os resultados obtidos em farelo de soja. A análise dos resultados apresenta que os fungos 58F, 79F, 24F, 18F e 21F, mostraram-se eficientes tanto em FES quanto em tributirina. Já o fungo 74F apresentou maior atividade hidrolítica (98,52 U/g substrato úmido) e menor halo de hidrólise em tributirina (1,17 mm), corroborando o discutido anteriormente.

Comportamento similar foi observado por Damaso et al. (2008) na pré-seleção em placas de microrganismos produtores de lipase em meio com óleo de oliva (pH 4,6). O maior halo de hidrólise (37 mm) foi evidenciado com a cepa *Aspergillus niger* 3T5B8 após 72 h de incubação. Já em FES usando farelo de soja suplementado de óleo de oliva, a cepa mutante de *Aspergillus niger* 11T53A14 foi a melhor produtora da enzima, após 48h de fermentação com atividade de 58,60 U/g (método titulométrico com óleo de oliva, pH7), contudo apresentou 20 mm de halo de hidrólise.

Tabela 4.1 - Avaliação comparativa entre os fungos selecionados como produtores de lipase com maior atividade hidrolítica em farelo de soja aos fungos em placa com indicador tributirina.

<i>Fungos selecionados</i>	<i>Atividade Hidrolítica (U/g substrato úmido)*</i>	<i>Medida halo (mm)**</i>
18F	71,91	22,20
21F	48,02	26,50
24F	46,64	26,70
79F	71,60	23,35
58F	86,53	20,95
130F	78,77	2,03
74F	98,52	1,17

* Após 48 horas de fermentação (Vargas et al., 2008)

** Após 5 dias de incubação

Em outro estudo de seleção de microorganismos produtores de lipases, Colen et al (2006) isolaram uma cepa de *Colletotrichum gloesporioides* que apresentou atividade de 18,8 U/mL em 72h de incubação. Azeredo et al. (2007), estudando a fermentação em torta de babaçu por *Penicillium restrictum* isolado de resíduos de torta de babaçu, obtiveram atividades hidrolíticas de 12,1 U/mL e 17,4U/g em FS (fermentação submersa) e FES, respectivamente.

4.2.3 Identificação dos Fungos Filamentosos Selecionados

Os gêneros dos fungos filamentosos selecionados como melhores produtores foram identificados pela chave de identificação de gêneros e posteriormente encaminhados para realização da técnica de biologia molecular, conforme descrito por Griebeler et al. (2009). Através do microcultivo, foi possível identificar o formato dos corpos de frutificação, verificando-se que os fungos mais promissores se tratavam basicamente de dois gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*.

Cerca de 87% dos fungos foram identificados como pertencentes ao gênero *Penicillium*, família Moniliaceae caracterizado por possuir apenas um ramo (estipe), onde em seu ápice nascem diretamente as fiáldes (ampuliformes, acenosas ou quase cilíndricas), podendo ser mono, bi, ter ou quaterverticiladas, de acordo com a quantidade de ramos. O gênero *Penicillium* apresenta ainda como características os conídios unicelulares, pequenos, com paredes celulares lisas ou

ornamentadas, normalmente pigmentados em cor verde ou azul (Barnett e Hunter, 1986).

Os 13% restantes pertencem ao gênero *Aspergillus*, caracterizado pelo micélio septado hialino ou escuro. Parte da massa micelial se diferencia em conidióforo, terminalmente com vesícula, que pode ser quanto à forma, globosa, hemisférica, elíptica ou clavada, e, quanto à coloração, hialina ou pigmentada. Na vesícula são formados os esterigmas ou fiáldes, diretamente ou sobre metulas (Barnett e Hunter, 1986).

A Figura 4.5 apresenta o aspecto microscópico das estruturas de frutificação de *Aspergillus* (56F) e *Penicillium* (58F), de duas linhagens apontadas neste trabalho como potenciais produtoras de lipases.

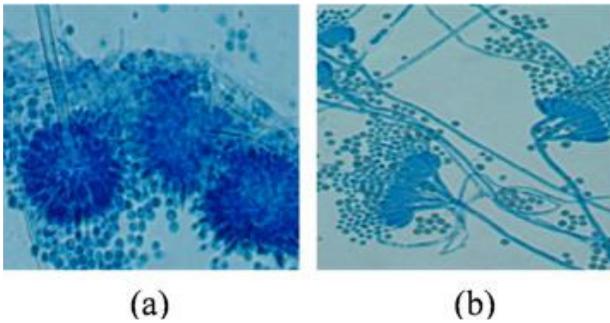


Figura 4.5 - Aspecto microscópico das estruturas de frutificação de *Aspergillus* (a) e de *Penicillium* (b).

As espécies de *Aspergillus* são consideradas iniciadoras de deterioração de sementes e grãos, podendo crescer com baixo teor de água; seguindo-se a contaminação por fungos do gênero *Penicillium*, em umidade relativa mais elevada, decorrente da atividade metabólica dos primeiros invasores. Os *Penicillium* e os *Aspergillus* são contaminantes comuns de regiões tropicais e subtropicais, predominando entre os demais fungos. A população de fungos pode variar de ano para ano e de local para local, por motivo de sobrevivência dos propágulos e das condições físico-químicas do substrato (Rossetto et al., 2003).

Dentre os diversos microrganismos isolados, os fungos filamentosos apresentaram os melhores resultados na fermentação em estado sólido (FES) como produtores de lipase com atividade hidrolítica (Tabela 4.2). Os fungos filamentosos possuem uma grande facilidade de se adaptar à FES, pois a penetração de hifas no substrato permite uma maior acessibilidade aos nutrientes do que no caso dos microrganismos

unicelulares, como as leveduras, reduzindo a distância em que os processos de difusão devem ocorrer. Isso é de grande importância principalmente nos estágios finais da fermentação, quando os nutrientes da superfície encontram-se esgotados (Mitchell e Lonsane, 1992; Mitchell et al., 2002).

Tabela 4.2 - Descrição das atividades hidrolíticas e classificação quanto ao gênero dos microrganismos produtores de lipases selecionados.

<i>Código</i>	<i>Fontes</i>	<i>Atividade Hidrolítica (U/g substrato úmido)</i>	<i>Gênero</i>
6F	Óleo de oliva	21,58 ± 1,10	<i>Penicillium sp.</i>
8F	Meio Cultura	13,73 ± 1,23	<i>Penicillium sp.</i>
13F	Extrato de Tomate	13,02 ± 0,49	<i>Penicillium sp.</i>
16F	Queijo Minas	11,52 ± 0,10	<i>Penicillium sp.</i>
18F	Solo	71,91 ± 0,43	<i>Penicillium sp.</i>
21F	Solo	48,02 ± 1,53	<i>Penicillium sp.</i>
22F	Nata	7,64 ± 1,03	<i>Penicillium sp.</i>
24F	Creme de leite	46,63 ± 0,40	<i>Penicillium sp.</i>
25F	Requeijão	19,01 ± 1,50	<i>Penicillium sp.</i>
27F	Solo	15,17 ± 2,03	<i>Penicillium sp.</i>
45F	Farelo de Soja	7,06 ± 1,68	<i>Penicillium sp.</i>
46F	Requeijão	8,90 ± 1,11	<i>Penicillium sp.</i>
48F	Requeijão	12,67 ± 1,60	<i>Aspergillus sp.</i>
50F	Requeijão	9,40 ± 3,13	<i>Penicillium sp.</i>
51F	Solo	9,11 ± 0,60	<i>Penicillium sp.</i>
56F	Solo	7,26 ± 3,11	<i>Aspergillus sp.</i>
58F	Farelo de Soja	86,53 ± 0,01	<i>Penicillium sp.</i>
59F	Óleo de oliva	20,23 ± 4,00	<i>Penicillium sp.</i>
64F	Requeijão	10,04 ± 0,86	<i>Penicillium sp.</i>
67F	Requeijão	9,87 ± 0,82	<i>Aspergillus sp.</i>
68F	Farelo de Soja	8,87 ± 1,17	<i>Aspergillus sp.</i>
69F	Farelo de Soja	9,93 ± 0,32	<i>Aspergillus sp.</i>
70F	Solo	9,11 ± 0,72	<i>Penicillium sp.</i>
72F	Requeijão	7,25 ± 1,00	<i>Penicillium sp.</i>
73F	Farelo de Soja	7,44 ± 1,75	<i>Penicillium sp.</i>
74F	Requeijão	98,52 ± 5,10	<i>Penicillium sp.</i>
79F	Farelo de Soja	71,60 ± 2,92	<i>Penicillium sp.</i>
80F	Requeijão	12,33 ± 2,54	<i>Penicillium sp.</i>
82F	Farelo de Soja	2,60 ± 0,75	<i>Penicillium sp.</i>
130F	Carne	78,76 ± 1,42	<i>Penicillium sp.</i>

Estudos de FES para produção de lipases reportados na literatura apresentam o uso de fungos filamentosos e leveduras, sendo citados *Penicillium candidum*, *Mucor miehei*, *Penicillium camembertii*, *Monascus fuliginosus*, *Rhizomucor pusillus* e *Rhizomucor rhizopodiformis* utilizando bagaço de cana (Cordova et al., 1998), *Aspergillus niger* utilizando torta de gergelim (Kamini et al., 1998), *Penicillium restrictum* utilizando torta de babaçu (Palma et al., 2000), *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja (Di Luccio et al., 2004) e *Aspergillus oryzae* utilizando torta de óleo de coco (Ramachandran et al., 2004). Em sistema de FES com farelo de soja, pesquisas relatam o uso de *Penicillium simplicissimum* (Vargas et al., 2008; Di Luccio et al., 2004) e *Penicillium* sp. (Wolski et al., 2009b) para produção de lipase.

Trabalhos paralelos realizados no Laboratório da URI (Griebel et al., 2009) mostraram que todos os fungos listados na Tabela 4.2 são geneticamente diferentes, através de técnica de RAPD. Desta forma, para as etapas subseqüentes foram escolhidos os fungos 74F e 58F ambos do gênero *Penicillium*, por serem bons produtores em farelo de soja e geneticamente diferentes. Trabalhos de identificação de espécie estão sendo conduzidos através de parcerias com outros institutos de pesquisa.

4.3 Seleção de microrganismos produtores de lipases com atividade de esterificação

4.3.1 Seleção por fermentação em meio sólido

Os microrganismos analisados provenientes de diferentes tipos de amostras apresentaram graus de produção de lipases com atividade de esterificação bastante distintos. Todos os 203 microrganismos isolados foram submetidos à fermentação em farelo de soja e então avaliados quanto à capacidade de produção de lipases com atividade catalítica na reação de síntese do oleato de *n*-propila.

O crescimento celular das cepas de leveduras que foram inoculadas em farelo de soja foi acompanhado instituindo a padronização do inóculo. As cepas 111L, 161L, 185L e 197L foram adicionadas à matriz sólida da fermentação apresentando crescimento celular em termos de densidade ótica em torno de 1,45. A capacidade dos referidos microrganismos em produzir lipases com atividade de esterificação de ésteres de cadeia longa representado pela reação de

síntese do oleato de *n*-propila é apresentada na Tabela 4.3.

As cepas fúngicas 74F e 69F, bem como a 186L e 185L produziram lipases capazes de catalisar reações de síntese em meio orgânico, ou seja, sistema aquo-restrito, bem como em meio aquoso, hidrólise (Tabela 4.3). Comportamento semelhante foi observado por Cardenas et al (2001), que demonstraram que todos os biocatalisadores testados foram ativos em ambos os sistemas, hidrólise e síntese. No entanto, a mais ativa em um sistema não foi necessariamente a mais ativa no outro, demonstrando as particularidades de cada lipase bruta produzida por diferentes culturas.

A Tabela 4.3 apresenta as 17 cepas microbianas isoladas com capacidade promissora de esterificação do ácido oléico em *n*-propanol. As cepas selecionadas foram obtidas de amostras de requeijão (74F, 145L e 197L) e de contaminações de meio de cultura (137L). Os microrganismos isolados do farelo de soja apresentaram as melhores atividades de esterificação, quando comparados aos demais microrganismos produtores. A fermentação do farelo de soja com as cepas 69F e 208L, resultou em atividades na faixa de 115,0 a 2,1 U/g substrato, respectivamente. Nagy et al. (2006), selecionaram trinta e oito fungos filamentosos cultivados em farelo de trigo hábeis para produção de lipases com potencial de aplicação em reações contendo solventes orgânicos.

Na presente pesquisa observou-se alta produção e fácil adaptação à FES em farelo de soja das cepas selecionadas, este fato pode estar relacionado com a origem das cepas, sendo estas isoladas de amostras do próprio farelo de soja. Outra particularidade evidenciada é que a maioria das cepas selecionadas são leveduras, apresentando apenas os fungos filamentosos 69F e 74F como potenciais produtores de lipase para reações de esterificação.

Um dos parâmetros mais importantes para ocorrência das reações de síntese em meio orgânico, catalisadas por enzimas, é a de atividade de água (a_w). Este pode ser diretamente relacionado com as taxas de reações enzimáticas, exemplificando a necessidade do estudo da influência deste parâmetro na eficiência das reações de esterificação. Os valores de a_w entre 0,25 e 0,45, correspondentes ao conteúdo de água de 0,5 a 1%, são reportados como precursores de bons resultados em reações de síntese com grande parte das lipases estudadas (Villeneuve, 2007; Chowdary e Prapulla, 2002). O grande conteúdo de água (45%) presente em reações de síntese do butil acetato, segundo Salah et al. (2007) pode estar vinculada à redução da atividade enzimática observada na referida pesquisa. Este fato se deve provavelmente à

desnaturação da lipase e/ou pela ocorrência da reação inversa, a hidrólise do éster, diminuindo assim seu conteúdo no meio reacional.

Tabela 4.3 - Atividades de esterificação do ácido oléico e *n*-propanol, e de hidrólise do óleo de oliva dos microrganismos selecionados.

<i>Micror- organismo</i>	<i>Fontes</i>	<i>Atividade de Esterificação (U/g substrato seco)</i>	<i>Atividade de Hidrólise (U/g substrato seco)</i>	<i>Classificação</i>
69F	Farelo de soja	114,96 ± 2,99	65,05 ± 0,43	Fungo
74F	Requeijão	60,08 ± 0,49	196,27 ± 10,24	Fungo
111L	Farelo de soja	64,80 ± 0,67	n.d.	Levedura
116L	Farelo de soja	5,47 ± 0,69	n.d.	Levedura
119L	Farelo de soja	8,94 ± 1,83	4,27 ± 0,30	Levedura
134L	Farelo de soja	21,11 ± 0,58	1,45 ± 0,33	Levedura
135L	Farelo de soja	44,50 ± 1,85	n.d.	Levedura
137L	Meio de cultura	9,52 ± 1,19	n.d.	Levedura
141L	Farelo de soja	20,21 ± 1,86	1,32 ± 0,12	Levedura
145L	Requeijão	18,20 ± 0,41	n.d.	Levedura
146L	Farelo de soja	12,95 ± 0,17	4,35 ± 0,10	Levedura
161L	Farelo de soja	100,42 ± 4,23	1,43 ± 0,60	Levedura
182L	Farelo de soja	28,25 ± 8,84	5,36 ± 0,75	Levedura
185L	Farelo de soja	2,59 ± 0,25	103,87 ± 3,12	Levedura
186L	Farelo de soja	65,02 ± 4,35	69,01 ± 3,20	Levedura
197L	Requeijão	19,39 ± 0,05	2,03 ± 0,06	Levedura
208L	Farelo de soja	2,08 ± 0,27	n.d.	Levedura

Desta forma, o conteúdo de água em reagentes, bem como o inserido no próprio biocatalisador pode ocasionar grande influência na taxa de reação, na conversão do substrato, nas reações desenvolvidas em meio orgânico, considerando também que as enzimas necessitam de pequenas quantidades de água para manter sua estrutura, seletividade, flexibilidade e principalmente a sua estabilidade e atividade catalítica (Ruiz et al., 2008; Fickers et al., 2006; Chowdary & Prapulla., 2002).

No presente trabalho o conteúdo médio de umidade encontrado nos extratos enzimáticos brutos, após 12 horas de liofilização, determinado em Karl Fisher foi de 12% ($\pm 1,3$). Significando uma umidade no meio reacional de 0,24%. Lipases oriundas de diferentes fontes apresentam necessidades de distintos perfis de atividade de água, como por exemplo, *Candida rugosa* e *Penicillium roqueforti* a_w 0,33, *Rhizopus oryzae*, *Mucor javanicus* a_w 0,54, *Aspergillus niger* a_w 0,75, foram avaliadas como ideais para reações de transesterificação a 40°C por 24 horas (Chowdary & Prapulla, 2002).

Ruiz et al (2008) obtiveram preparados enzimáticos com conteúdo de umidade de 1%, (a_w 0,33 a 0,68), através do processo de liofilização, sendo verificado que valores de a_w maiores que 0,68 causaram diminuição na velocidade da reação. Observaram também que a estocagem do biocatalisador a 4°C durante 7 meses manteve 80% da atividade inicial, revelando que o biocatalisador produzido por *Rhizopus* sp. em FES pode ser usado com sucesso na síntese do etil oleato.

4.3.2 Caracterização parcial da lipase bruta com atividade de esterificação

4.3.2.1 Avaliação da especificidade do extrato enzimático frente a diferentes alcoóis

As velocidades de reações de síntese e o método de dosagem de atividade são influenciados por diferentes variáveis, tais como, a fonte e atividade catalítica da enzima, o tipo de reação, o substrato, e o solvente usado, bem como a temperatura (Ruiz et al., 2008). A estabilidade da enzima e a sua atividade em solventes orgânicos depende não somente das propriedades e concentrações do solvente orgânico, mas também da natureza da enzima (Torres e Castro, 2004). Assim, torna-se extremamente importante o controle dos parâmetros que regem o processo de síntese para, desta forma, chegar-se à velocidade máxima de

reação (Ibrahim, 2008).

Lipases microbianas produzidas em meio contendo solventes orgânicos, óleos e gorduras podem apresentar alta estabilidade em solventes orgânicos (Karadzic et al., 2006). Assim, neste trabalho realizou-se a avaliação do efeito de diferentes álcoois na atividade catalítica da lipase produzida por fermentação em estado sólido, com as 17 cepas microbianas previamente selecionadas. Foi então, possível verificar quais lipases brutas foram capazes de promover as maiores taxas de reação relacionada a cada álcool usado na reação. Os resultados desta avaliação encontram-se na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Descrição das atividades de esterificação do ácido oléico com os alcoóis, metanol, etanol, *n*-propanol e *n*-butanol.

<i>Microrganismo</i>	<i>Metanol</i> (U/g substrato)	<i>Etanol</i> (U/g substrato)	<i>n-Propanol</i> (U/g substrato)	<i>n-Butanol</i> (U/g substrato)
69F	1,57 ^a ± 0,09	104,97 ^{a,b} ± 0,20	114,96 ^a ± 2,99	32,56 ^a ± 1,35
74F	29,88 ^b ± 2,25	76,08 ^c ± 1,91	60,08 ^b ± 0,49	32,84 ^a ± 0,5
111L	38,63 ^c ± 0,82	101,67 ^{a,b} ± 0,60	64,80 ^b ± 0,67	13,84 ^b ± 0,68
116L	1,52 ^a ± 0,17	81,85 ^c ± 1,76	5,47 ^c ± 0,69	10,38 ^{b,c} ± 1,06
119L	16,53 ^d ± 2,18	45,69 ^d ± 2,43	8,94 ^{c,d} ± 1,83	12,75 ^{b,d} ± 0,39
134L	2,40 ^a ± 0,19	107,94 ^{a,c} ± 0,32	21,11 ^e ± 0,58	19,57 ^e ± 0,35
135L	42,83 ^c ± 2,06	53,72 ^f ± 1,19	44,50 ^f ± 1,85	27,80 ^f ± 1,32
137L	28,77 ^b ± 1,40	27,42 ^{g,i,j} ± 2,54	9,52 ^{c,g} ± 1,19	9,58 ^{c,d,g} ± 0,80
141L	101,03 ^f ± 1,06	12,28 ^h ± 1,45	20,21 ^{d,e,g} ± 1,86	17,43 ^{b,e} ± 1,42
145L	53,55 ^e ± 2,23	20,43 ⁱ ± 2,18	18,20 ^{d,e,g} ± 0,41	23,57 ^h ± 0,23
146L	14,44 ^d ± 0,91	1,42 ^j ± 0,13	12,95 ^{c,e} ± 0,17	8,59 ^{c,i} ± 0,08
161L	18,44 ^d ± 0,49	13,64 ^h ± 1,35	100,42 ^h ± 4,23	18,32 ^e ± 1,22
182L	42,82 ^c ± 2,17	13,54 ^h ± 1,33	28,25 ^e ± 8,84	8,50 ^{c,j} ± 1,03
185L	18,89 ^d ± 1,58	55,18 ^f ± 1,20	2,59 ^c ± 0,25	11,99 ^{b,g,i,j} ± 0,86
186L	82,25 ^g ± 0,56	21,99 ^{g,i} ± 2,50	65,02 ^b ± 4,35	27,25 ^{f,h} ± 0,96
197L	26,62 ^b ± 1,49	12,27 ^h ± 0,24	19,39 ^{d,e,g} ± 0,05	28,71 ^{a,f} ± 1,44
208L	49,05 ^e ± 0,08	33,03 ^{g,j} ± 0,12	2,08 ^c ± 0,27	29,01 ^{a,f} ± 1,36

Médias ± erros seguidos de letras iguais em cada coluna, representativa aos álcoois utilizados na reação de esterificação do ácido oléico, não diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Tukey

Os dados apresentados na Tabela 4.4 foram avaliados através do teste de Tukey. O uso do metanol na reação de síntese demonstrou que as cepas 141L e 186L, seguida das 145L com igual atividade a 208L (101,03; 82,25 e 53,55 igual a 49,05 U/g substrato), produziram lipases

com maior capacidade para síntese do metil oleato.

As maiores atividades de esterificação usando etanol foram obtidas pelas lipases produzidas com as cepas 134L e 69F, sendo esta igual à 111L, (107,94; 104,97, 101,67 U/g substrato, respectivamente). Na sequência pode-se ressaltar ainda as cepas 116L igual por sua vez à 74F (81,85; 76,08 U/g substrato), respectivamente por apresentarem atividades consideráveis ao se comparar, aos resultados obtidos, com o álcool metílico. Neste caso, as cepas fúngicas 69F, 111L e 134L foram indicadas como potenciais produtoras de lipases para reação de síntese do etil oleato.

As atividades utilizando *n*-propanol foram, em média, de mesma ordem de grandeza do que as obtidas com etanol. Entretanto as atividades em *n*-butanol foram, em média, as menores obtidas, indicando que os microrganismos estudados produzem lipases com maior potencial para álcoois de cadeia curta, comportamento peculiar observado também por Romero et al. (2007) onde o butanol resultou em decréscimo da atividade enzimática.

Pode-se observar que a adição dos álcoois metanol e etanol, na reação orgânica, resultaram em distintos comportamentos das lipases provenientes das cepas microbianas selecionadas. Não houve uma tendência entre os resultados, para cada meio reacional houve a classificação de um grupo de cepas produtoras, ressaltando a importância do processo investigativo quanto à especificidade de cada lipase ao substrato usado como biocatalisador para síntese de ésteres de ácidos graxos.

A Figura 4.6 apresenta uma comparação das cepas mais promissoras obtidas neste trabalho. O comportamento catalítico das lipases brutas, em meio orgânico, com ácido oléico e os álcoois, metanol, etanol, *n*-propanol e *n*-butanol, indica que os solventes polares (metanol, etanol e propanol) apresentam efeito positivo na atividade enzimática de lipases em reações de esterificação. Efeito similar foi obtido quanto à estabilidade da lipase de *Aspergillus niger* MYA135, em reações de acrescidas metanol, etanol, propanol e acetona (Romero et al., 2007)

Na síntese do *n*-propil oleato destaca-se a cepa fúngica 69F, com atividade de 114,96 (U/g substrato), sendo a mais promissora dentre todas as reações de síntese compostas pelos diferentes álcoois avaliados, com exceção do metanol. No entanto, em ordem decrescente destacam-se ainda as cepas 161L, seguida das 186L que por sua vez é igual ($p < 0,05$) a 74F e à 111L com atividades de esterificação entre 100,42 a 64,80 (U/g substrato). As atividades em *n*-butanol foram pouco

expressivas em comparação aos demais álcoois, sendo as maiores em torno de 33,0 (U/g substrato).

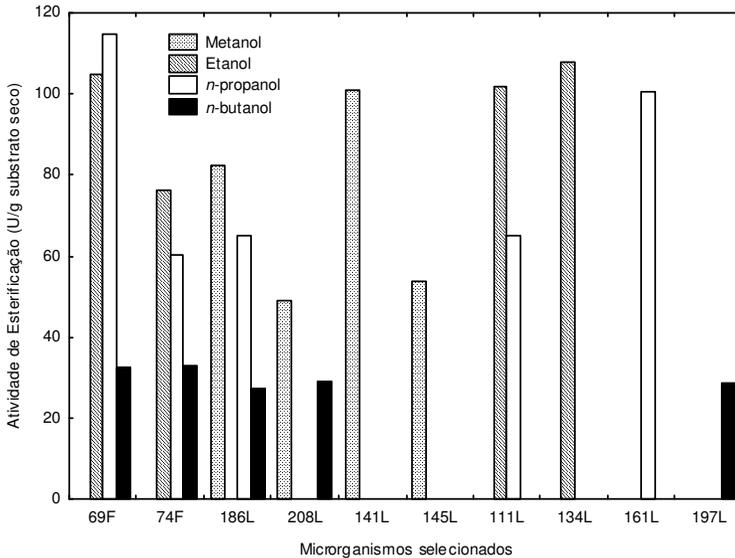


Figura 4.6 - Efeito dos álcoois, metanol, etanol, *n*-propanol e *n*-butanol na reação de esterificação do ácido oléico catalisada por lipases brutas produzidas pelos microrganismos que se destacaram dentre os selecionados como produtores de lipase com atividade de esterificação.

Da mesma forma, Karadzic et al. (2006) verificaram que a lipase de *Pseudomonas aeruginosa* apresentou efeito inibitório frente álcoois de cadeia longa, como *n*-butanol e o iso-propanol ($\log P = 0,8$ e $0,28$, respectivamente). O efeito inibitório causado por álcoois de cadeia longa pode ser devido a sua adsorção ao substrato, resultando em bloqueio da interação da enzima com o substrato. Assim, em contrapartida frente a álcoois de menor cadeia a lipase apresentou atividade residual de 80 e 90% após exposição de 24 h nos álcoois metanol e etanol, respectivamente.

Ao se avaliar os resultados obtidos com o estudo das atividades de esterificação do ácido oléico com cada álcool, pode-se afirmar que a cepa 69F com atividade de 114,96 (U/g substrato) foi a mais promissora na síntese do *n*-propil oleato. Esta cepa apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparada às demais, sendo maior que as obtidas com álcool metílico (141L) e álcool etílico

(69F), 101,03 e 104,97(U/g substrato), as quais não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

A produção de biodiesel usando óleo de girassol como substrato e lipases imobilizadas de *Pseudomonas fluorescens*, *Mucor javanicus*, *Candida rugosa* e *Rhizopus niveus*, em reações com metanol, etanol, *n*-propanol e *n*-butanol foi avaliada por Iso et al. (2001), na busca da composição de meio reacional eficiente. A reação com *n*-propanol proporcionou maior eficiência dentre os demais sistemas, considerando que as reações não foram acrescidas de solvente como *n*-hexano por exemplo.

A esterificação do ácido oléico usando lipase livre de *Rizomucor miehei*, testando álcoois tais como, etanol, 1-butanol, 1-pentanol e 2-etil-1-hexanol, foi avaliada por Kraai et al. (2008), indicando que após 1 hora de reação, 100% de conversão do ácido oléico foi observada quando o álcool 1-butanol fazia parte da reação.

Lipases estáveis especialmente frente ao metanol e etanol, são consideradas de extrema importância, devido a possibilidade de serem usadas como catalisadores em reações para produção de biodiesel (Shimada et al., 2002; Fukuda et al., 2001). Assim, pesquisas que envolvem a identificação e produção de lipases tolerantes a álcoois são de grande relevância, já que atualmente há necessidade da redução do custo dos biocatalisadores aplicados na produção de biocombustíveis por via enzimática.

São poucos os trabalhos que apresentam lipases com atividade de esterificação produzidas em sistema de fermentação em estado sólido na literatura, entre estes, cita-se os resultados obtidos por Ruiz et al., (2008) na produção do etil oleato com lipase de *Rhizopus sp* resultando em atividade de esterificação de 1,5 U/mL e os resultados da síntese do butil oleato com lipase imobilizada de *Aspegillus niger* com atividade de 120 U/g (Dutra et al., 2008). As atividades obtidas nesta pesquisa com ácido oléico e etanol (108,0 U/g) foram superiores às obtidas por Ruiz et al. (2008). Este comportamento demonstra que estas são específicas para álcoois de cadeia curta. Ressalta-se que as condições de produção das lipases pelos microrganismos isolados neste trabalho não foram otimizadas, sendo assim atividades maiores podem ser encontradas com estudo da produção.

As cepas fúngicas 69F e 74F selecionadas demonstraram menor especificidade em relação às demais cepas (leveduras), pois em três dentre os quatro álcoois avaliados (etanol, *n*-propanol e o butanol) foram observadas altas atividades de esterificação, ressaltando que a síntese do *n*-propil oleato, seguida do etil oleato foram as mais promissoras. A

literatura reporta o uso de *Penicillium coryophilum* como potencial produtor de lipase para uso em biocatálise de reações na área da química fina (Baron et al., 2005), bem como *Aspergillus niger* como produtor de lipase hábil para reações de esterificação enancioseletiva (Carvalho et al., 2005).

4.3.2.2 Especificidade do extrato enzimático frente a diferentes ácidos graxos

A esterificação de ácidos de cadeia longa, tal como o ácido oléico, apresenta-se como uma boa ferramenta para discriminar lipases dentre as demais hidrolases (esterases e proteases) possivelmente contidas no material fermentado. Ressalta-se que são amplamente utilizados na seleção de hidrolases substratos como a tributirina ou óleo de oliva, contudo deve-se considerar que a atividade de síntese não está diretamente relacionada com a atividade de hidrólise (Maria e Gago, 1999). Neste caso, metodologias específicas devem ser utilizadas para indicação de lipases microbianas com atividade de síntese.

A avaliação da especificidade das lipases produzidas em FES com as 17 cepas selecionadas, em relação ao ácido oléico e ao ácido láurico foi realizada utilizando o álcool *n*-propanol como co-substrato. A Tabela 4.5 apresenta a atividade de esterificação das 17 cepas selecionadas como produtoras de lipases com atividade de esterificação nos diferentes ácidos avaliados. Pela análise de variância seguida do teste de Tukey foi possível observar que as atividades de esterificação obtidas nas reações com ácido láurico, com os extratos brutos liofilizados das lipases produzidas pelos microrganismos 111L e 182L (80,56 e 81,51U/g substrato), foram igualmente consideradas as maiores obtidas em relação às demais cepas avaliadas, ($p < 0,05$).

Dentre as cepas selecionadas, as cepas fúngicas 69F e 74F bem como as leveduras 161L e 186L apresentaram as maiores atividade de esterificação com ácido oléico sendo usado como substrato da reação. Importante ressaltar que atividades em torno de 100U/g substrato foram encontradas usando o extrato lipolítico liofilizado obtido pela fermentação com o fungo 69F, assim como com a levedura 161L, ambas em sistema sólido, sendo estas 66% e 84% respectivamente maiores das encontradas quando o ácido láurico era usado como substrato. Comportamento contrário foi observado ao se avaliar a atividade de esterificação das cepas 111L, 135L e 182L as quais apresentaram maior atividade quando o ácido láurico foi usado, em torno de 80 U/g

substrato, sendo 24%, 44% e 65% respectivamente maiores em comparação as obtidas com ácido oléico.

Tabela 4.5 - Especificidade das lipases produzidas em FES com as 17 cepas selecionadas, considerando a atividade de esterificação destes, frente ao ácido oléico e láurico com *n*-propanol.

<i>Microrganismo</i>	<i>Atividade de Esterificação com Ácido Oleico (U/g substrato)</i>	<i>Atividade de Esterificação com Ácido Láurico (U/g substrato)</i>
69F	114,96 ^a ± 2,99	39,44 ^a ± 0,22
74F	60,08 ^b ± 0,49	5,40 ^b ± 0,64
111L	64,80 ^b ± 0,67	80,56 ^c ± 5,85
116L	5,47 ^c ± 0,69	10,56 ^{b,d} ± 0,04
119L	8,94 ^{c,d} ± 1,83	39,51 ^a ± 0,73
134L	21,11 ^e ± 0,58	13,73 ^{d,e} ± 0,86
135L	44,50 ^f ± 1,85	80,05 ^{b,e,h} ± 7,04
137L	9,52 ^{c,g} ± 1,19	10,08 ^b ± 0,87
141L	20,21 ^{d,e,g} ± 1,86	1,02 ^{b,e,f} ± 0,18
145L	18,20 ^{d,e,g} ± 0,41	11,98 ^{b,e,g} ± 0,74
146L	12,95 ^{c,e} ± 0,17	6,28 ^{b,e} ± 2,40
161L	100,42 ^h ± 4,23	15,87 ^{d,f,g,h} ± 2,72
182L	28,25 ^e ± 8,84	81,51 ^c ± 2,75
185L	2,59 ^c ± 0,25	52,81 ⁱ ± 0,11
186L	65,02 ^b ± 4,35	8,58 ^{b,e,h} ± 1,35
197L	19,39 ^{d,e,g} ± 0,05	9,58 ^{b,e,h} ± 0,77
208L	2,08 ^c ± 0,27	9,41 ^{b,e,h} ± 0,06

Médias ± erros seguidos de letras iguais em cada coluna, de cada éster graxo utilizados na reação de esterificação com *n*-propanol, não diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

A Figura 4.7 permite a visualização do comportamento das cepas que apresentaram as maiores atividades em ácido oléico e láurico, dentre as 17 cepas selecionadas apresentadas na Tabela 4.5. Cabe evidenciar que a cepa fúngica 69F e as leveduras 111L e 135L apresentaram atividades significativas em ambos os substratos, característica importante considerando as possibilidades de aplicações em diferentes óleos vegetais.

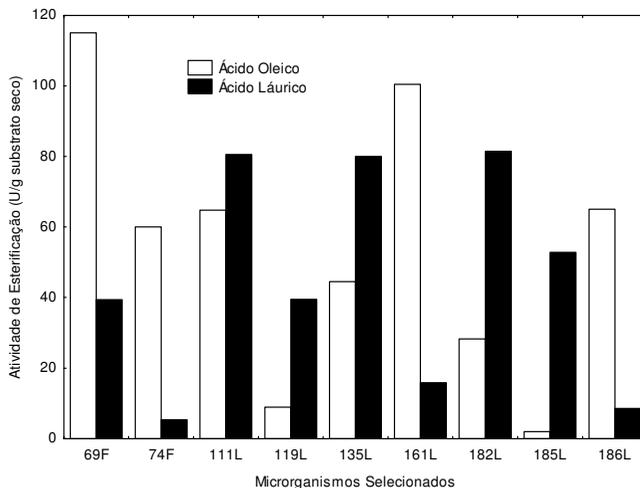


Figura 4.7 - Atividades de esterificação obtidas com o uso de lipases brutas produzidas pelos microrganismos que se destacaram dentre os selecionados como produtores de lipase com atividade de esterificação, em ácido oléico e láurico, com *n*-propanol.

Maria et al. (2002) avaliaram o comportamento de culturas comerciais, verificando sua capacidade de síntese relacionando ao índice de pureza destas. O estudo da capacidade de enzimas brutas apresentarem diferentes comportamentos catalíticos pode estar vinculado à existência de isoenzimas no material não purificado (Casa et al., 2006). A reação de esterificação é portanto considerada dependente da concentração das enzimas lipolíticas presentes nos preparados enzimáticos. Contudo, pesquisas relatam a possibilidade da presença de isoenzimas contidas normalmente em biocatalisadores brutos, também em algumas lipases adquiridas comercialmente (Maria et al., 2002; Maria e Gago, 1999).

Desta forma, a seleção de biocatalisadores eficientes em sistemas orgânicos, justifica a relevância de pesquisas que busquem a seleção de lipases. Na presente pesquisa, a seleção de cepas microbianas produtoras de lipases, com atividade de síntese revelou, dentre os preparados enzimáticos brutos, alguns microrganismos hábeis a produzir lipases com atividade de síntese. Dentre estes, citam-se as leveduras 69F, 161L, eficientes produtoras de lipases hábeis a catalisar a reação de produção de *n*-propil oleato, bem como, as cepas 74F, 111L e 186L também produtoras interessantes de lipase para reações de síntese de ésteres graxos.

4.4 Estudo da produção de lipase hidrolítica

Esta sessão apresenta o estudo do comportamento cinético da produção de lipases hidrolíticas por FES em farelo de soja com diferentes suplementações. O potencial de produção de lipase pelos fungos selecionados 58F e 74F foi avaliado. Os suplementos avaliados foram fontes compostas, ou seja, resíduos como o melaço (ME), água de maceração de milho (AMM), hidrolisado de levedura (HL), bem como óleo de soja (OS), uréia (UR) e a mistura de ambos (UROS). Como controle, foi utilizado o farelo de soja sem suplementação (FP).

Os suplementos utilizados nesta pesquisa foram selecionados com base em suas composições. Os suplementos provenientes de resíduos agroindustriais (HL, AMM e o ME) tornam-se alternativas interessantes devido ao baixo custo de obtenção e a presença de micronutrientes em sua composição. Assim, buscando avaliar o efeito de cada suplemento adicionado ao farelo de soja, a razão C/N de todas as suplementações foi mantida idêntica à do farelo de soja sem suplemento (C/N 6,11). Para viabilizar a utilização da uréia como suplemento, mantendo-se a restrição da relação C/N constante, óleo de soja foi adicionado até a obtenção de C/N 6,11.

Através do emprego da técnica de planejamento de experimentos, verificaram-se o efeito da temperatura, umidade, concentração do suplemento, concentração de esporos e granulometria do farelo de soja. Na seqüência realizou-se o estudo das condições de produção da fermentação com o microrganismo e o suplemento selecionados anteriormente. A partir das definições das condições ótimas da produção da lipase hidrolítica, verificou-se o efeito da variação da razão C/N do suplemento na produtividade da enzima.

4.4.1 Avaliação da suplementação do meio de fermentação

Lipídios são geralmente indutores essenciais para uma alta produção de lipase (Dominguez et al., 2003). Desta forma, muitos estudos têm avaliado o uso das tortas de oleaginosas em bioprocessos de produção de lipase. Aplicação biotecnológica de torta de girassol, soja, coco, mostarda, palma, algodão, canola, oliva entre outras, têm resultado na obtenção de enzimas, antibióticos, biopesticidas, vitaminas etc. Na produção de enzimas, as tortas e farelos são usados como substratos para FES ou como suplemento do meio de produção, em termos de fonte carbono e nitrogênio (Ramachandran et al., 2007). A

produção de lipase por fermentação em estado sólido com diferentes substratos sólidos tem sido reportada em trabalhos da literatura (Castilho et al., 2000; Holker et al., 2004). No entanto, poucos estudos da utilização de farelo de soja têm sido encontrados, dentre estes pode-se citar pesquisas usando o fungo *Penicillium simplicissimum* (Vargas et al., 2008; Di Luccio et al., 2004) e *Penicillium verrucosum* (Kempka et al., 2008), *Penicillium* sp. (Wolski et al., 2009b) e a cepa mutante de *Aspergillus niger* 11T53A14 (Damaso et al., 2008).

A utilização do farelo de soja para produção de lipases torna-se interessante, pois este é um dos subprodutos da cadeia de produção de biodiesel, cuja produção tem crescido continuamente no Brasil, com perspectivas ainda maiores devido à meta de utilização de 5% de biodiesel em todo o diesel do País até o ano de 2013. A utilização deste substrato na produção de lipases pode ser um meio de aproveitamento do excedente deste produto no mercado, agregando valor ao mesmo.

A Tabela 4.6 apresenta a caracterização do farelo de soja, utilizado nos experimentos como fonte de nutrientes e suporte para o crescimento microbiano, bem como dos suplementos utilizados como coadjuvantes na produção das lipases hidrolíticas pelas cepas microbianas selecionadas.

Tabela 4.6 - Caracterização do farelo de soja e dos suplementos utilizados na fermentação em estado sólido.

Fontes Suplementação	Gordura (%)	Umidade (%)	Carbono (%)	Nitrogênio (%)
Farelo de Soja Puro (FP)	2,89	10,84	42,55	6,96
Óleo de Soja (OS)	100,00	0,00	79,20	0,04
Melaço de Cana (ME)	0,70	39,00	31,92	0,50
Água de Maceração de Milho (AMM)	0,60	59,00	18,70	3,40
Hidrolizado de Levedura (HL)	1,20	9,60	36,67	9,04
Uréia (UR)	0	0	20,00	46,64

O substrato suporte, farelo de soja, é um meio potencial para fermentação em estado sólido devido ao seu conteúdo de carbono e nitrogênio, conforme descrição na Tabela 4.6. No entanto, a suplementação deste com outras fontes de nutrientes pode resultar em

um aumento expressivo na produção de lipases hidrolíticas, levando em consideração as necessidades nutricionais de cada microrganismo.

O teor de umidade de cada suplemento foi levado em consideração nos ajustes de umidade dos meios durante os experimentos realizados por FES. Os suplementos oriundos de resíduos industriais, hidrolisado de levedura (HL), a água de maceração de milho (AMM), e melação de cana (ME) consistem em boas fontes de carbono, além de uma diversidade de outros compostos que podem atuar como fonte de micronutrientes. O óleo de soja (OS) foi utilizado como fonte de carbono e a uréia (UR) como suplemento de nitrogênio.

4.4.1.1 Efeito da suplementação

O estudo do efeito da suplementação do farelo de soja usado na fermentação para produção de lipases com *Penicillium* sp. 58F foi avaliado em 48 e 72 h de fermentação, o resultado deste teste preliminar pode ser visualizado na Tabela 4.7. Através da análise de variância seguida de testes de Tukey, observou-se que proporcionou variação na produtividade da enzima, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$).

Verificou-se que a adição de 1% (m/v) dos suplementos ao farelo de soja, não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), entre a produtividade obtida em 48 h de fermentação com farelo de soja sem suplemento (FP), e a obtida em meio contendo óleo de soja (OS) e a água de maceração de milho (AMM). Alguns estudos também mostram as vantagens na suplementação de meios. O bagaço de cana suplementado com óleo de oliva resultou em eficiente produção de lipase por *Rhizopus rhizopodiformis* e *Rhizomucor pusillus*, obtendo-se atividades de 79,60U/g e 20,24U/g com o uso de precursores adequados (Cordova et al., 1998).

É interessante ressaltar que o farelo puro apresenta uma das maiores atividades por grama de substrato seco, demonstrando assim ser um bom suporte e fonte de nutrientes para a produção de lipase hidrolítica. A queda da atividade enzimática ocorrida em 72h de fermentação no farelo puro sugere a possibilidade da produção de proteases reduzindo os níveis de lipases extracelulares contidas no meio da fermentação, comportamento este observado em pesquisas anteriores sobre produção de lipases microbianas (Di Luccio et al., 2004; Palma et al., 2000; Gombert et al., 1999). O farelo puro resultou em atividade hidrolítica de 149,73U/g de farelo seco em 48h de fermentação. Este valor é bastante promissor se comparado aos obtidos pelo fungo

Penicillium simplicissimum 21,00 U/g em farelo de soja (Di Luccio et al., 2004) e 30,00 U/g em torta de babaçu (Gutarra et al., 2007), 15,17 U/g da lipase produzida em farelo de soja com *Penicillium* sp. (Wolski et al., 2009b). Em todos estes trabalhos a atividade hidrolítica foi determinada usando óleo de oliva como substrato e método de titulação para quantificação.

Tabela 4.7 - Comportamento da suplementação do farelo de soja na produção de lipases por FES com *Penicillium* 58F, avaliadas através da atividade hidrolítica em óleo de oliva em pH 7.

Suplementos	Atividade lipásica U/g farelo seco*		Produtividade (U/g farelo seco/h)*	
	48 h	72 h	48 h	72 h
	OS	120,59 ± 16,25 ^{ac}	140,98 ± 19,01 ^a	2,51 ± 0,34 ^{ac}
ME	76,87 ± 12,36 ^b	155,82 ± 10,12 ^a	1,60 ± 0,26 ^b	2,16 ± 0,14 ^a
AMM	158,82 ± 13,61 ^a	133,33 ± 0,86 ^c	3,31 ± 0,28 ^a	1,85 ± 0,01 ^{ac}
HL	103,40 ± 10,01 ^{bce}	153,67 ± 0,48 ^a	2,15 ± 0,21 ^{bce}	2,13 ± 0,01 ^a
FP	149,73 ± 0,34 ^a	39,61 ± 5,85 ^b	3,12 ± 0,01 ^a	0,55 ± 0,10 ^b

* Médias ± desvio padrão seguidas de letras diferentes nas colunas diferem estatisticamente entre si (p≤0.05) pelo teste de Tukey.

O aumento da concentração de fontes de nitrogênio nos meios pode contribuir para a produção de lipases microbianas, conforme demonstrado na produção de lipase em torta de *Jatropha curcas* (pinhão manso) por *Pseudomonas aeruginosa* suplementada com NaNO₃ (Mahanta et al., 2008).

Na produção de lipase em fermentação submersa suplementada com (NH₄)₂SO₄, ocorreu aumento de três vezes a atividade da lipase produzida por *Candida* sp. (Tan et al., 2003). Rodriguez et al. (2006) observaram que a suplementação do bagaço de cana de açúcar com uréia possibilitou o aumento de seis vezes da atividade enzimática quando comparada, por exemplo, ao uso do extrato de levedura.

Assim, de acordo com os resultados obtidos, e o reportado na literatura optou-se por incluir a uréia no estudo da suplementação do farelo de soja para produção de lipases hidrolíticas com os fungos 58F e 74F, padronizando-se a razão C/N. Desta forma, foi possível a comparação de cada suplementação com o padrão (FP), identificando o real efeito destas fontes frente à produtividade da enzima, eliminando-se

o efeito de uma maior concentração de carbono ou nitrogênio na comparação entre os suplementos.

4.4.1.2 Razão C/N constante

O objetivo desta etapa foi avaliar o comportamento cinético da produção de lipases extracelulares com os *Penicillium* 58F e 74F em farelo de soja acrescido de diferentes suplementos, mantendo-se a relação C/N aproximadamente igual à do farelo de soja puro (6,11). Desta forma buscou-se avaliar o efeito de outros nutrientes presentes nas fontes suplementares na produção lipase. A descrição dos suplementos adicionados como fontes complementares de carbono e nitrogênio ao farelo de soja, na produção de lipase hidrolítica podem ser visualizados na Tabela 4.8.

O pH do meio contendo farelo de soja acrescido dos referidos suplementos foi acompanhado durante o processo fermentativo com o *Penicillium* 58F (Tabela 4.9) e 74F (Tabela 4.10), sendo o pH da solução de cada suplemento determinado após o preparo.

Tabela 4.8 - Características dos suplementos adicionadas para produção de lipase hidrolítica em fermentação em estado sólido (FES) com farelo de soja.

Suplementos	Componente da matriz para fermentação	Carbono (%)	Nitrogênio (%)	Relação (C/N)
OS	Farelo de soja + OS	43,34	6,96	6,23
ME	Farelo de soja + ME	42,87	6,96	6,15
AMM	Farelo de soja + AMM	42,73	6,99	6,11
HL	Farelo de soja + HL	42,92	7,05	6,10
FP	Farelo de Soja Puro	42,55	6,96	6,11
UR	Farelo de soja + UR	42,75	7,43	5,76
UROS	Farelo de soja + (0,6%) UR + (2,0%) OS	45,37	7,43	6,11

Pode-se notar que há um aumento de pH no meio de fermentação considerando todas as suplementações bem como o farelo puro (FP), em relação aos tempos de fermentação, possivelmente devido a ação das lipases produzidas atuando sobre os ácidos do meio. Verifica-se também uma tendência a estabilização em 120 h para as duas cepas (58F e 74F) testadas de acordo com os dados apresentados nas Tabelas 4.9 e 4.10

respectivamente. Neste tempo de fermentação verifica-se que o suplemento AMM apresenta o maior pH para ambas as cepas avaliadas.

Tabela 4.9 - Evolução do pH nos diferentes meios de fermentação utilizados para produção de lipase no decorrer do processo fermentativo com *Penicillium* 58F.

Suplementos	pH Suplemento	Fermentação			
		0 h	48 h	96 h	120 h
OS	6,42 ± 0,06	6,60 ± 0,03	7,20 ± 0,14	7,79 ± 0,02	7,63 ± 0,16
ME	6,09 ± 0,55	6,53 ± 0,01	7,11 ± 0,01	7,94 ± 0,06	7,85 ± 0,09
AMM	4,26 ± 0,03	6,49 ± 0,02	7,49 ± 0,07	7,85 ± 0,06	7,99 ± 0,05
HL	6,22 ± 0,01	6,43 ± 0,01	7,05 ± 0,37	7,65 ± 0,16	7,67 ± 0,06
FP	5,87 ± 0,03	6,51 ± 0,01	7,16 ± 0,16	7,65 ± 0,02	7,75 ± 0,01
UR	5,85 ± 0,46	6,79 ± 0,06	7,35 ± 0,03	7,86 ± 0,18	7,86 ± 0,08
UROS	6,00 ± 0,11	6,70 ± 0,01	7,38 ± 0,09	7,85 ± 0,03	7,69 ± 0,07

O controle de pH está relacionado com a manutenção da homogeneidade dos sistemas em meio sólido. Pode-se aplicar para correção e manutenção do pH no meio os sais de amônio, uréia e/ou uso de agentes tamponantes (Nagel et al., 1999). O aumento do pH durante a fermentação pode estar relacionado com o consumo de ácidos graxos pelo microrganismo.

Tabela 4.10 - Evolução dos valores de pH nos diferentes meio de fermentação utilizados para produção de lipase no decorrer do processo fermentativo com *Penicillium* 74F.

Suplementos	pH Suplemento	Fermentação			
		0 h	48 h	96 h	120 h
OS	6,18 ± 0,28	6,65 ± 0,01	7,54 ± 0,01	7,71 ± 0,08	8,06 ± 0,01
ME	5,50 ± 0,11	6,47 ± 0,07	7,56 ± 0,09	6,90 ± 0,21	7,68 ± 0,13
AMM	4,38 ± 0,19	6,50 ± 0,01	7,58 ± 0,06	7,68 ± 0,29	8,08 ± 0,08
HL	6,11 ± 0,13	6,46 ± 0,05	6,79 ± 0,02	7,78 ± 0,03	7,50 ± 0,30
FP	5,38 ± 0,22	6,50 ± 0,21	7,33 ± 0,08	7,79 ± 0,19	7,78 ± 0,06
UR	5,28 ± 0,33	6,70 ± 0,05	7,35 ± 0,03	7,95 ± 0,03	7,63 ± 0,23
UROS	6,05 ± 0,17	6,69 ± 0,01	7,38 ± 0,09	7,88 ± 0,03	7,62 ± 0,02

4.4.1.3 Cinética da produção de lipase em FES por *Penicillium 58F*

O comportamento cinético da produção de lipase por FES com farelo de soja e o fungo 58F está apresentado na Figura 4.8. A atividade hidrolítica quantificada em pH 4 (Figura 4.8-a) foi menos expressiva com todos os suplementos, bem como com no caso do farelo puro, ao ser comparada com a atividade quantificada em pH 7 (Figura 4.8-b) e 9 (Figura 4.8-c). A suplementação com uréia e óleo de soja possibilitou a obtenção da maior atividade dentre as demais suplementações. Em termo de produtividade em 48 h de fermentação os valores obtidos em pH 4 (2,90U/g.h) foram bastante semelhantes em pH 7 (3,00 U/g.h) e pH 9 (2,80 U/g.h). No entanto, ao se analisar os demais suplementos é possível perceber a discrepância entre os comportamentos cinéticos, sugerindo a produção de distintas proteínas.

A produção de lipase em meio suplementado com uréia e óleo de soja foi estatisticamente superior às obtidas nos demais suplementos testados ($p < 0,05$) nos diferentes tempos em pH 4. Já em pH 7 observou-se que as atividades obtidas com UROS foram consideradas iguais ($p < 0,05$) às obtidas com os suplementos ME, HL, AMM e UR. A análise dos resultados de cada suplemento obtido em pH 9 apresentaram particularidades em cada tempo de fermentação. No entanto, a mistura de suplementos uréia / óleo de soja permaneceu entre as maiores produções, seguidas das suplementações com UR, ME, HL e AMM. Em 96 h, a utilização de farelo sem suplementação demonstrou ser eficiente.

A adição de óleo de soja como suplemento ao farelo de soja não aumentou a produção de lipase nos distintos pH de dosagem de atividade hidrolítica, contradizendo citações, de que óleos e gorduras seriam bons indutores na elevação dos índices de produtividade de enzimas lipolíticas. Alguns autores, no entanto, mostram que a suplementação muitas vezes não leva ao aumento da produção de lipases, devido a efeito de inibição por excesso de substrato. A suplementação da torta de gergelim com óleo de gergelim e girassol para produção de lipase por FES com *Aspergillus niger* MTCC 2594 não proporcionou incremento na produtividade (Kamini et al., 1998). A suplementação de torta de soja com óleo de soja, com o uso do fungo *Penicillium simplicium*, pesquisado por Di Luccio et al. (2004) também não causou aumento da produção de lipase. Tal comportamento atribui-se ao fato de o farelo de soja se constitui em boa fonte de nutrientes, provocando inibição da produção enzimática por excesso de substrato.

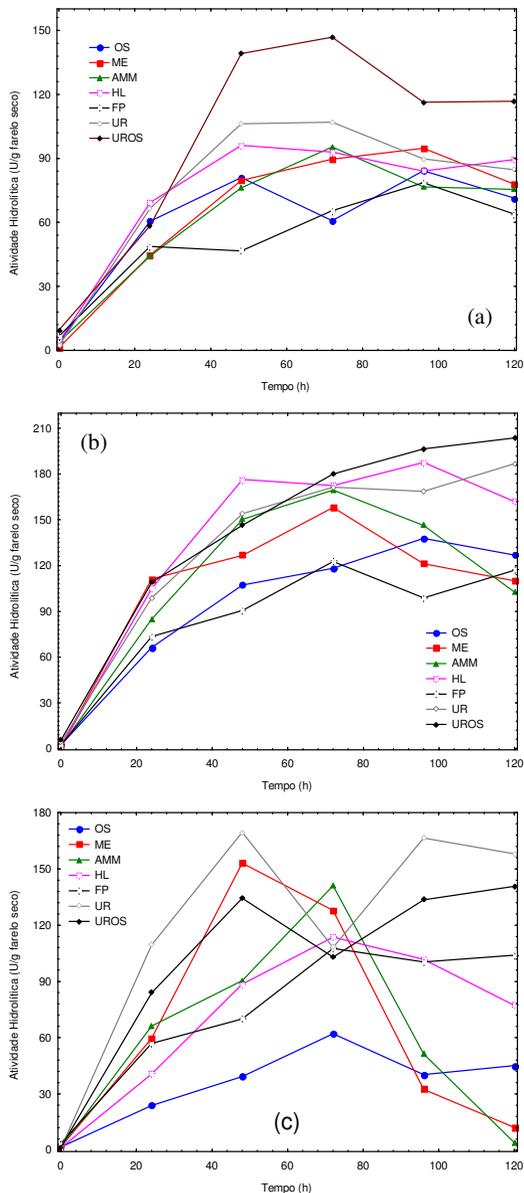


Figura 4.8 - Cinética da produção de lipase pelo *Penicillium 58F* determinadas em pH 4,0 (a), pH 7,0 (b) e pH 9,0 (c), em farelo de soja suplementado com óleo de soja (OS), melação (ME), água de maceração de milho (AMM), hidrolisado de levedura (HL), farelo de soja (FP), uréia (UR) e uréia acrescida de óleo de soja (UROS).

Considerando que na maioria das cinéticas nos diferentes pH, a suplementação com a uréia acrescida de óleo de soja apresentou efeito pronunciado no aumento da produtividade, a Tabela 4.11 apresenta os detalhes dos resultados da fermentação com meio suplementado de uréia acrescida de óleo de soja. O pico de produção de lipase ácida foi observado em 72 h com atividade hidrolítica de 147,00 U/g. Para as atividades em meio alcalino e neutro o pico ocorreu em 120 h com atividade de 140,74 U/g e 203,70 U/g respectivamente. Contudo, no caso das atividades em meio alcalino e ácido, bons resultados foram obtidos já em 48 h de fermentação.

Tabela 4.11 - Cinética da atividade hidrolítica de lipase produzida com *Penicillium* 58F em farelo de soja suplementado com uréia acrescida de óleo de soja (UROS) em diferentes pH.

Nível	Atividade Hidrolítica (U/g farelo seco)				
	24h	48h	72h	96h	120h
pH4	58,41±	139,18 ±	146,81 ±	116,27 ±	116,79 ±
	3,77 ^b	2,14 ^a	15,40 ^a	7,17 ^c	1,72 ^c
pH7	108,94	146,61 ±	180,20 ±	196,61 ±	203,70 ±
	± 1,15 ^c	5,63 ^b	11,57 ^a	15,79 ^a	6,43 ^a
pH9	83,93 ±	134,41 ±	102,93 ±	133,55 ±	140,74 ±
	10,48 ^b	23,06 ^a	6,97 ^{a,b}	18,85 ^a	8,33 ^a

Médias ± desvio padrão seguidas de letras diferentes nas linhas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Outros autores já demonstraram que diferentes fontes de nitrogênio usadas como suplementos em meios fermentativos podem aumentar consideravelmente a produção de lipases extracelulares. Pode-se citar a produção de lipases microbianas por FES em torta de *Jatropha curcas* (Mahanta et al., 2008), bagaço de cana (Rodrigues et al., 2006) e torta de babaçu (Gombert et al., 1999).

4.4.1.4 Cinética da produção de lipase em FES por *Penicillium* 74F

O comportamento cinético da produção de lipase através da fermentação em estado sólido com farelo de soja e *Penicillium* 74F é apresentado na Figura 4.9. Não foi possível verificar efeito significativo ($p < 0,05$) entre as diferentes suplementações para este microrganismo em termos da quantificação da atividade hidrolítica em pH 4 (Figura 4.9-a)

pH 7 (Figura 4.9-b) e pH 9 (Figura 4.9-c). Quanto à produtividade em 48 h de fermentação, no caso da suplementação com uréia acrescida de óleo de soja, observou-se uma diferença quando se comparou a produtividade em pH 4 (2,10U/g.h), ao pH 7 (3,10U/g.h) e ao pH 9 (2,00U/g.h), para o meio suplementado com uréia acrescida de óleo de soja.

A fermentação em estado sólido para produção de lipase com atividade hidrolítica usando farelo de soja e *Penicillium* 58F demonstrou ser promissora para obtenção de lipases ácidas ou alcalinas em 48 h e 120 h de fermentação com atividades de 139,18 e 140,74 U/g, respectivamente, conforme demonstrado na Tabela 4.12. O pico de produção da lipase neutra usando *Penicillium* 58F foi em 120 h (204,00 U/g), com expressiva atividade enzimática, principalmente se comparada com as atividades das lipase produzida em torta de babaçu com *e Penicillium simplicissimum* 17,40 U/g (Azeredo et al., 2007) e 30,00 U/g (Gutarra et al., 2007).

Tabela 4.12 - Comparação entre as atividades hidrolíticas obtidas através da fermentação com farelo de soja suplementado com uréia acrescida de óleo de soja nos tempos de máxima produtividade com os microrganismos selecionados.

Cepas	Atividade Hidrolítica (U/g farelo seco)					
	pH 4		pH 7		pH 9	
	48 h	72 h	96 h	120 h	96 h	120 h
<i>Penicillium</i> 58F	139,18 ± 2,14 ^a	146,81 ± 15,40 ^a	196,61 ± 15,79 ^a	203,70 ± 6,43 ^a	133,56 ± 18,85 ^a	140,74 ± 8,33 ^a
<i>Penicillium</i> 74F	115,51 ± 4,11 ^b	109,49 ± 3,53 ^b	148,11 ± 5,27 ^b	141,30 ± 11,72 ^b	140,10 ± 4,13 ^a	97,95 ± 9,48 ^b

Médias ± desvio padrão seguidas de letras diferentes nas colunas, em cada pH, diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Com base nos resultados obtidos na etapa de seleção da suplementação do meio de fermentação, usando as cepas microbianas selecionadas, 74F e 58F, optou-se por realizar o estudo da produção de lipase com o fungo 58F em meio suplementado com uréia acrescida de óleo de soja.

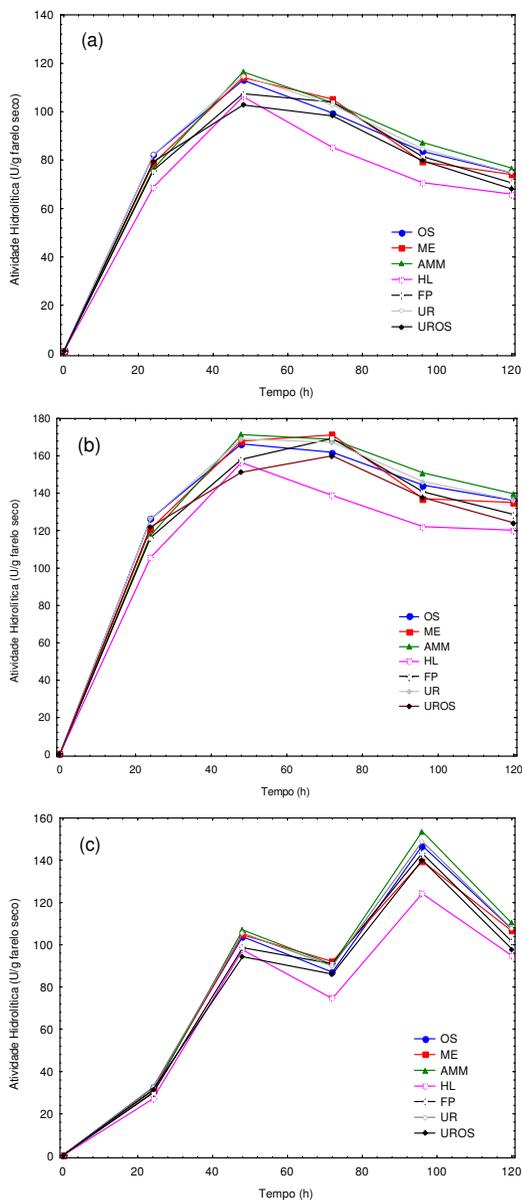


Figura 4.9 - Cinética da produção de lipase pelo *Penicillium 74F* determinadas em pH 4,0 (a), pH 7,0 (b) e pH 9,0 (c), em farelo de soja suplementado com óleo de soja (OS), melão (ME), água de maceração de milho (AMM), hidrolizado de levedura (HL), farelo de soja (FP), uréia (UR) e uréia acrescida de óleo de soja (UROS).

4.4.1.4 Cinética da produção de protease

O acompanhamento da produção de protease durante o processo de biosíntese da lipase em FES é um fator importante. Em média, o aumento do pH após 20 h de fermentação é acompanhado com o aumento dos níveis de protease. Este comportamento provável é devido à degradação de aminoácidos, que liberam grupamento amino no meio, que este ao formar amônia retira íons hidrogênio do meio, ocasionando assim o aumento de pH. Neste sentido, o tipo de suplemento está diretamente correlacionado à produção de proteínas distintas (Palma et al., 2000).

O controle de pH pode, então, ser indispensável para certos processos de FES, mas a não homogeneidade dos sistemas em meio sólido é uma dificuldade. Pode-se aplicar para correção e manutenção do pH no meio sais de amônio e uréia e/ou agentes tamponantes (Nagel et al., 1999). A Figura 4.10 apresenta o comportamento cinético da produção de protease no meio de fermentação com a cepa de *Penicillium* 58F (a) e 74F(b) em farelo de soja suplementado.

Não foi observado aumento relevante no valor de pH durante as 120 h de fermentação, dados apresentados no item 4.2.2.2. Este comportamento pode estar diretamente associado à baixa atividade proteásica obtida durante a produção de lipase. A baixa produção de protease refletiu-se também no comportamento cinético da produção de lipase (Fig 4.7 e 4.8) onde se observa que para ambas lipases produzidas não há uma diminuição de atividade lipásica ao longo do tempo de cultivo.

Pode-se observar que os valores obtidos na fermentação para ambos os microrganismos são muito baixos, o farelo de soja parece mostrar uma tendência a reprimir a produção de proteases por fungos do gênero *Penicillium*. Por exemplo, *Penicillium verrucosum* produz em 120 h de fermentação cerca de 0,65U/g de protease em farelo de soja (Kempka et al., 2008). Pequenas atividades proteásicas (até 0,45 U/g) foram também observadas por Vargas et al. (2008), em fermentação de farelo de soja com *Penicillium simplicissimum*. Os resultados obtidos são muito interessantes já que os extratos obtidos sofrem pequena influência das proteases, permitindo maior estabilidade dos mesmos.

A FES com *Penicillium restrictum* e torta de babaçu apresenta um aumento de aproximadamente 1,7 vezes da atividade proteásica quando se adiciona Tween 80 ao meio basal. A alcalinidade do meio de cultura é observada de forma associada ao aumento dos níveis de protease (Palma et al., 2000).

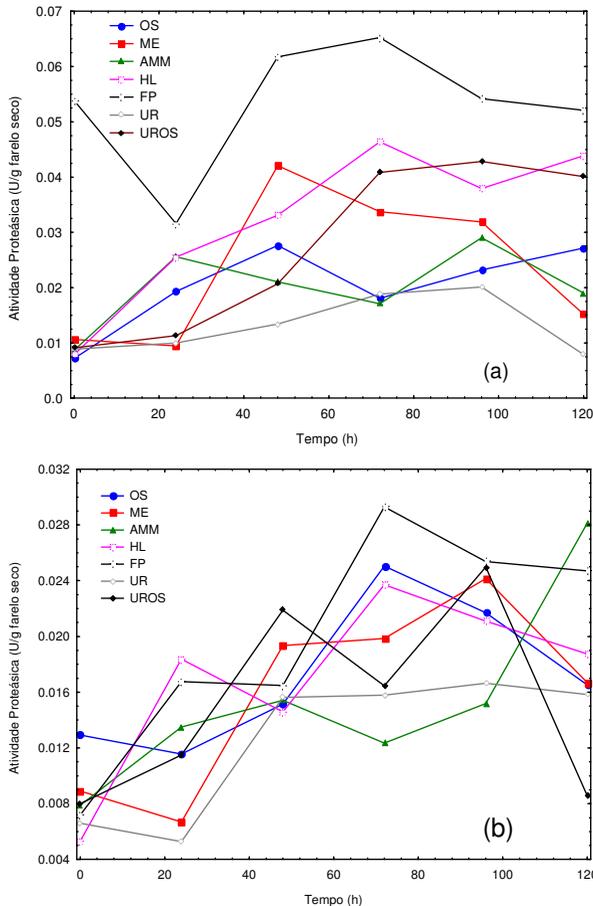


Figura 4.10 - Avaliação cinética da produção de protease do *Penicillium* 58F (a) e 74F (b) em farelo de soja suplementado com óleo de soja (OS), melão (ME), água de maceração de milho (AMM), hidrolisado de levedura (HL), farelo de soja (FP), uréia (UR) e uréia acrescida de óleo de soja (UROS).

4.4.2 Maximização da produção da lipase hidrolítica

O estudo da maximização da produção de lipase hidrolítica foi desenvolvido com o suplemento definido anteriormente como o que resultou nas maiores atividades hidrolíticas.

4.4.2.1 Screening de variáveis para produção de lipase utilizando *Penicillium 58F*

Inicialmente foi avaliada a influência da variação do volume do inóculo na produtividade da enzima. Este estudo foi conduzido devido à necessidade de redução do volume de inóculo (2,5 mL) adicionado na matriz de fermentação, para adequação às condições de estudo do planejamento experimental.

Considerando o fato de que o volume menor de inoculo poderia implicar na dificuldade de distribuição de esporos no meio de fermentação, podendo levar a prováveis variações nos resultados de produção da enzima. Ressalta-se que neste estudo a concentração de esporos/g de substrato não foi alterada. Segundo Gutarra et al. (2007), a mudança de estratégia do inóculo influenciou produtividade de lipase em FES com *Penicillium simplicissimum* em torta de babaçu, ao comparar o inóculo convencional ao com *pellets* do fungo crescidos em meio líquido. A atividade lipásica aumentou 1,5 vezes, com 10 vezes menos esporos adicionados no inóculo convencional (suspensão de esporos/g torta de babaçu) (Gutarra, et al., 2007).

As demais condições experimentais usadas para obtenção dos dados de atividade descritos na Tabela 4.13 foram baseadas no ponto central do planejamento PB12 (Tabela 4.14). Ambos inóculos possuíam uma concentração de esporos de maneira a se obter 1×10^8 esporos /g farelo seco no meio de fermentação final.

Tabela 4.13 - Estudo da influência do volume de inóculo em 96 e 120 h de fermentação com *Penicillium 58F* para produção de lipase hidrolítica em farelo de soja suplementado com 5,5% (p/p) de uréia e óleo de soja.

Volume Inóculo (mL)	Atividade Hidrolítica (U/g farelo de soja seco)					
	pH 4		pH 7		pH 9	
	96 h	120 h	96 h	120 h	96 h	120 h
1,5	125,25	137,53 ^a ±	123,60 ^a	192,85 ^a ±	93,89 ^a	110,08 ^a ±
	±3,89	6,23	±2,91	9,29	±8,11	9,43
2,5	105,27 ^a	111,21 ^b ±	107,94 ^a	129,40 ^a ±	83,52 ^a	95,15 ^a ±1
	±6,70	10,65	±5,70	12,18	±4,06	,93

Médias ± desvio padrão seguidas de letras diferentes nas colunas, em cada pH, em 96 e 120 h de fermentação, diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0.05$) pelo teste de Tukey.

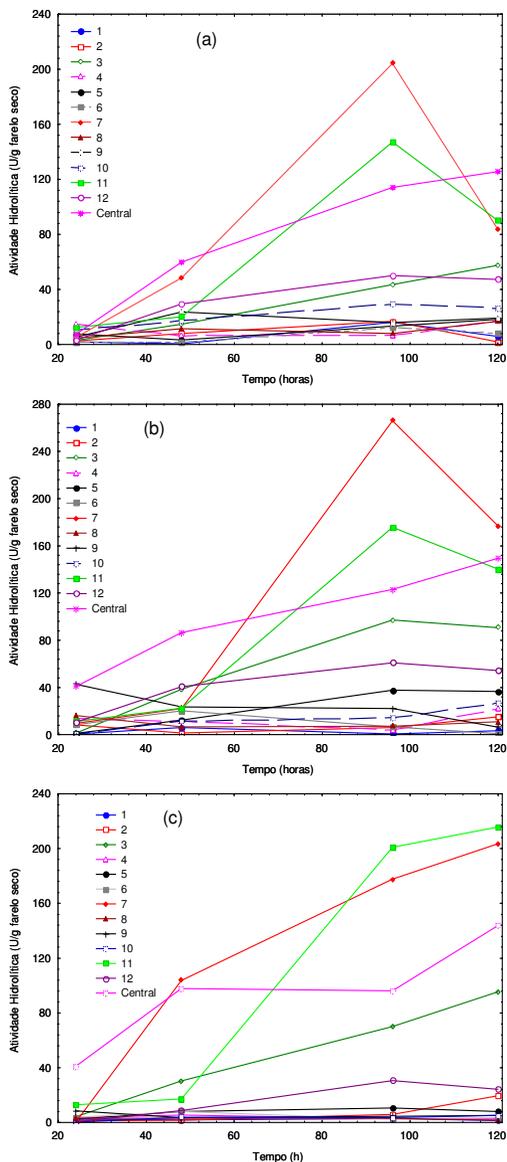


Figura 4.11 - Cinética de produção de lipase para cada condição estudada no primeiro planejamento experimental (PB12), temperatura (°C), umidade (%), granulometria (Tyler), concentração de esporos (esporos/g) e do suplemento (uréia acrescida de óleo de soja, UROS %), na produção de lipase hidrolítica com *Penicillium* F58 em fermentação com farelo de soja.

Em todos os ensaios não se observou diferença significativa ($p < 0,05$) de atividade em função do volume de inóculo, com exceção da dosagem em pH 4,0 em 120 h de fermentação. Desta forma, optou-se por usar o volume de inóculo de 1,5mL, o que facilitou a execução dos ensaios do planejamento com baixas concentrações de água no farelo. Condição semelhante foi utilizada na produção de lipase com o fungo *Aspergillus niger*, onde 0,25mL de inóculo foi utilizado em 10 g de farelo de trigo e torta de gergelim, perfazendo $1,07 \times 10^8$ esporos/g de substrato (Kamini et al., 1998).

A cinética de produção de lipase para cada experimento da Tabela 4.14 é apresentada na Figura 4.11. Os resultados apresentados são referentes aos dados de atividade hidrolítica determinadas em pH 4 (a), pH 7 (b), pH 9 (c).

A Tabela 4.14 apresenta a matriz do primeiro planejamento experimental (PB12) com os valores reais e codificados de cada variável estudada, bem como a variável de resposta, atividade hidrolítica, em 96 e 120 h de fermentação. A análise de efeito das variáveis estudadas no primeiro planejamento experimental (Tabela 4.14) é apresentada na Tabela 4.15. Os dados analisados em termos de atividade hidrolítica são descritos de acordo com os pH de dosagens, em 96 h e 120 h de fermentação. É importante ressaltar que o objetivo de sua realização é selecionar variáveis que sejam importantes para o processo. As variáveis estatisticamente significativas com $p < 0,1$ foram incluídas para evitar deixar algum fator importante fora da avaliação de seu efeito no processo (Rodrigues e Iemma, 2005).

Tabela 4.14 - (a). Matriz do planejamento experimental Plackett-Burman com valores reais e codificados das variáveis manipuladas e as respectivas respostas em termos de atividade hidrolítica em 96 h de fermentação, e diferentes pH de medida de atividade.

Ensaaios	Condições Experimentais					Atividade hidrolítica (U/g farelo seco) 96 h		
	<i>T</i> (°C)	<i>U</i> (%)	<i>Granul</i> (Tyler)	[Esporos]	[UROS]%	<i>pH4</i>	<i>pH7</i>	<i>pH9</i>
	1	+1 (34)	-1 (35)	+1 (16)	-1 (1x10 ⁷)	-1 (1)	16,20 ± 2,15	0,65 ± 0,13
2	+1 (34)	+1 (75)	-1 (60)	+1 (2x10 ⁸)	-1 (1)	16,84 ± 0,12	6,22 ± 0,10	5,80 ± 0,85
3	-1 (20)	+1 (75)	+1 (16)	-1 (1x10 ⁷)	+1 (10)	43,49 ± 7,01	97,26 ± 6,58	70,01 ± 0,10
4	+1 (34)	-1 (35)	+1 (16)	+1 (2x10 ⁸)	-1 (1)	6,79 ± 0,12	4,31 ± 1,00	2,67 ± 0,80
5	+1 (34)	+1 (75)	-1 (60)	+1 (2x10 ⁸)	+1 (10)	13,39 ± 0,33	37,62 ± 5,09	10,54 ± 0,75
6	+1 (34)	+1 (75)	+1 (16)	-1 (1x10 ⁷)	+1 (10)	11,96 ± 0,07	6,73 ± 2,41	2,25 ± 0,14
7	-1 (20)	+1 (75)	+1 (16)	+1 (2x10 ⁸)	-1 (1)	204,27 ± 4,43	266,18 ± 2,68	177,68 ± 4,83
8	-1 (20)	-1 (35)	+1 (16)	+1 (2x10 ⁸)	+1 (10)	8,02 ± 0,51	7,35 ± 1,01	3,11 ± 1,21
9	-1 (20)	-1 (35)	-1 (60)	+1 (2x10 ⁸)	+1 (10)	16,02 ± 2,04	22,14 ± 0,40	4,53 ± 0,33
10	+1 (34)	-1 (35)	-1 (60)	-1 (1x10 ⁷)	+1 (10)	29,33 ± 0,40	14,54 ± 2,76	3,54 ± 0,97
11	-1 (20)	+1 (75)	-1 (60)	-1 (1x10 ⁷)	-1 (1)	147,12 ± 1,59	175,85 ± 4,03	200,96 ± 4,14
12	-1 (20)	-1 (35)	-1 (60)	-1 (1x10 ⁷)	-1 (1)	50,16 ± 1,36	61,03 ± 2,28	30,66 ± 0,62
13	0 (27)	0 (55)	0 (32)	0 (1x10 ⁸)	0 (5,5)	129,85 ± 4,92	123,85 ± 1,40	97,13 ± 1,66
14	0 (27)	0 (55)	0 (32)	0 (1x10 ⁸)	0 (5,5)	106,42 ± 4,65	124,08 ± 5,92	88,69 ± 1,65
15	0 (27)	0 (55)	0 (32)	0 (1x10 ⁸)	0 (5,5)	106,28 ± 2,87	121,54 ± 2,91	102,34 ± 1,64

Tabela 4.14 - (b). Matriz do planejamento experimental Plackett-Burman com valores reais e codificados das variáveis, manipuladas e as respectivas respostas em termos de atividade hidrolítica em 120 h de fermentação, e diferentes pH de medida de atividade.

Ensaio	Condições Experimentais							
	<i>T</i> (°C)	<i>U</i> (%)	<i>Granul</i> (Tyler)	[Esporos]	[UROS] %	<i>Atividade hidrolítica (U/g farelo seco)120 h</i>		
						pH 4	pH 7	pH 9
1	+1 (34)	-1 (35)	+1 (16)	-1 (1x10 ⁷)	-1 (1)	5,88 ± 0,78	3,39 ± 0,41	1,46 ± 0,41
2	+1 (34)	+1 (75)	-1 (60)	+1 (2x10 ⁸)	-1 (1)	2,02 ± 0,43	15,15 ± 1,40	19,57 ± 0,14
3	-1 (20)	+1 (75)	+1 (16)	-1 (1x10 ⁷)	+1 (10)	57,65 ± 12,30	90,80 ± 2,03	95,41 ± 0,10
4	+1 (34)	-1 (35)	+1 (16)	+1 (2x10 ⁸)	-1 (1)	17,53 ± 0,69	21,77 ± 2,61	2,44 ± 0,75
5	+1 (34)	+1 (75)	-1 (60)	+1 (2x10 ⁸)	+1 (10)	18,23 ± 0,58	36,57 ± 2,39	8,03 ± 1,20
6	+1 (34)	+1 (75)	+1 (16)	-1 (1x10 ⁷)	+1 (10)	8,42 ± 4,86	0,90 ± 0,32	3,59 ± 0,46
7	-1 (20)	+1 (75)	+1 (16)	+1 (2x10 ⁸)	-1 (1)	83,79 ± 4,43	176,81 ± 2,35	203,68 ± 4,89
8	-1 (20)	-1 (35)	+1 (16)	+1 (2x10 ⁸)	+1 (10)	17,01 ± 2,63	11,06 ± 0,32	1,59 ± 0,50
9	-1 (20)	-1 (35)	-1 (60)	+1 (2x10 ⁸)	+1 (10)	19,16 ± 0,03	6,30 ± 2,73	5,19 ± 0,38
10	+1 (34)	-1 (35)	-1 (60)	-1 (1x10 ⁷)	+1 (10)	26,40 ± 1,81	27,26 ± 1,50	5,23 ± 0,27
11	-1 (20)	+1 (75)	-1 (60)	-1 (1x10 ⁷)	-1 (1)	90,02 ± 4,69	140,29 ± 0,69	215,95 ± 1,68
12	-1 (20)	-1 (35)	-1 (60)	-1 (1x10 ⁷)	-1 (1)	47,40 ± 3,40	54,26 ± 1,69	24,32 ± 0,29
13	0 (27)	0 (55)	0 (32)	0 (1x10 ⁸)	0 (5,5)	143,23 ± 7,71	155,64 ± 1,04	153,90 ± 13,25
14	0 (27)	0 (55)	0 (32)	0 (1x10 ⁸)	0 (5,5)	113,70 ± 4,04	140,96 ± 0,32	149,82 ± 2,11
15	0 (27)	0 (55)	0 (32)	0 (1x10 ⁸)	0 (5,5)	119,94 ± 4,79	151,88 ± 3,22	127,92 ± 5,30

Tabela 4.15 - (a) Efeito das variáveis de processo, estudadas no planejamento experimental (PB12), na produção da lipase hidrolítica após 96 e 120 h de fermentação, determinadas em pH 4.

Parâmetros	96 h				120 h			
	Efeito	Desvio	t(2)	p	Efeito	Desvio	t(2)	p
Média	60,41*	3,50	17,25	0,01	51,36*	4,02	12,78	0,01
(1)Temp(L)	-62,43*	7,83	-7,97	0,02	-39,43*	8,99	-4,39	0,05
(2)U(L)	51,76*	7,83	6,61	0,02	21,13	8,99	2,35	0,14
(3)Gran (L)	2,98	7,83	0,38	0,74	-2,16	8,99	-0,24	0,83
(4)Esporos(L)	-5,49	7,83	-0,70	0,56	-13,00	8,99	-1,45	0,28
(5)UROS (L)	-53,19*	7,83	-6,79	0,02	-16,63	8,99	-1,85	0,21

*Efeitos significativos $p < 0,1$

Tabela 4.15 - (b) Efeito das variáveis de processo, estudadas no planejamento experimental (PB12), na produção da lipase hidrolítica após 96 e 120 h de fermentação, determinadas em pH 7.

Parâmetros	96 h				120 h			
	Efeito	Desvio	t(2)	p	Efeito	Desvio	t(2)	p
Média	71,29*	0,36	196,56	0,01	68,87*	1,97	34,97	0,01
(1)Temp(L)	-93,29*	0,81	-115,03	0,01	-62,41*	4,40	-14,18	0,01
(2)U(L)	79,97*	0,81	98,61	0,01	56,08*	4,40	12,74	0,01
(3)Gran(L)	10,85*	0,81	13,37	0,01	4,15	4,40	0,94	0,45
(4)Esporos(L)	-2,04	0,81	-2,52	0,13	-8,21	4,40	-1,86	0,20
(5)UROS(L)	-54,77*	0,81	-67,54	0,01	-39,80*	4,40	-9,04	0,01

*Efeitos significativos $p < 0,1$

Tabela 4.15 - (c) Efeito das variáveis de processo, estudadas no planejamento experimental (PB12), na produção da lipase hidrolítica após 96 e 120 h de fermentação, determinadas em pH 9.

Parâmetros	96 h				120 h			
	Efeito	Desvio	t(2)	p	Efeito	Desvio	t(2)	p
Média	53,51*	1,78	30,08	0,01	67,88*	3,61	18,81	0,01
(1)Temp(L)	-76,58*	3,98	-19,25	0,01	-84,30*	8,07	-10,45	0,01
(2)U(L)	70,01*	3,98	17,60	0,01	84,33*	8,07	10,45	0,01
(3)Gran(L)	0,40	3,98	0,10	0,93	4,98	8,07	0,62	0,60
(4)Esporos(L)	-17,64*	3,98	-4,43	0,05	-17,58	8,07	-2,18	0,16
(5)UROS(L)	-54,42*	3,98	-13,68	0,01	-58,06*	8,07	-7,20	0,02

*Efeitos significativos $p < 0,1$

Pode-se visualizar na Tabela 4.15 (b) o efeito das variáveis de processo na atividade hidrolítica determinadas em pH 7. Os dados

obtidos após 96 h de fermentação resultaram nas maiores atividades dosadas em pH 7 (266,18 U/g farelo de soja seco), no ensaio 7 do planejamento (Tabela 4.14), conforme pode-se visualizar claramente na Figura 4.11 (b). Neste caso, a variável temperatura do processo e suplementação (UROS) influenciaram negativamente ($p < 0,1$) na produção da lipase hidrolítica. A umidade da matriz sólida (farelo de soja) exerceu influência positiva no processo fermentativo, sendo que todas as variáveis citadas mantiveram este comportamento nos tempos cinéticos de 96 e 120 h. No entanto, a granulometria indicou exercer efeito positivo no processo somente no tempo de 96 h de fermentação em pH 7.

A Tabela 4.15 (c) apresenta a análise de efeito das variáveis de processo na atividade hidrolítica determinada em pH 9. Os dados obtidos após 120 h de fermentação resultaram nas maiores atividades quando efetuadas as dosagens em pH 9 (Tabela 4.14), conforme pode-se visualizar claramente na Figura 4.11 (c). Neste tempo, a temperatura do processo e suplementação (UROS) influenciaram negativamente ($p < 0,1$) a produção da lipase hidrolítica. Comportamento contrário foi observado quanto ao conteúdo de umidade da matriz sólida (farelo de soja), sendo que este exerceu influência positiva no processo fermentativo, sendo que todas as variáveis citadas mantiveram este comportamento nos tempos de 96 e 120 h. No entanto, a concentração de esporos apresentou efeito negativo no processo somente no tempo de 96 h.

Observa-se que em cada pH foram observados valores de atividade hidrolítica distintos, sendo que esta peculiaridade pode ser indicativa da produção de um *pool* de lipases hidrolíticas, indicadas pelos bons resultados de atividade nas faixas de pH avaliados. Em particular, a incorporação de diferentes substâncias lipídicas pode resultar na produção de diferentes isoenzimas (Zarevúcka et al., 2005; Saxena et al., 2003b). Assim, cada sistema resultará em diferentes proteínas, com características específicas quanto a sua especificidade na catálise de reações, e conseqüentemente dos produtos formados (Asther et al., 2002).

Os ensaios 7 (20°C, 75%U, Tyler 1-2 mm, 2×10^8 esp/g e 1% UROS) e 11 (20°C, 75%U, Tyler 0,50-0,25mm, 1×10^7 esp/g e 1% UROS) apresentaram as maiores produtividades hidrolíticas, conforme pode-se visualizar na Figura 4.12, quando comparadas ao ponto central do planejamento fracionário. Cabe ressaltar que a queda da produtividade obtida entre os tempos cinéticos de 96 e 120 h de fermentação nos ensaios 7 e 11 foi mais expressiva em pH 4 (Figura

4.11(a)) ao ser comparada ao pH 7 (Figura 4.11 (b)). Nas mesmas condições, as atividades hidrolíticas determinadas em pH 9 mostram um comportamento contrário, havendo um incremento de 14% e 7,5% na atividade enzimática entre 96 e 120 h de fermentação, respectivamente (Figura 4.11(c)).

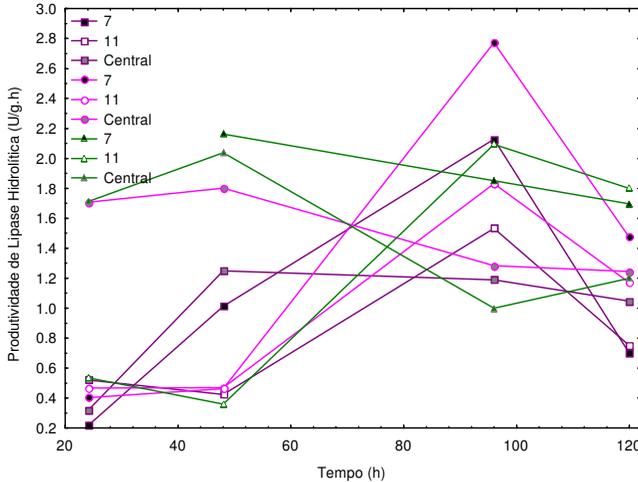


Figura 4.12 - Produtividade da enzima hidrolítica dos ensaios 7 (símbolos preenchidos), 11 (símbolos abertos), e Central (símbolos preenchidos em cinza), do planejamento experimental Plackett-Burman (Tabela 4.14), sendo as dosagem da atividade em pH 4(■), pH7(○), e pH9 (▲).

Embora o ensaio central tenha se destacado em termos de produtividade, a temperatura do processo de fermentação dos ensaios 7 e 11 torna-se mais competitiva devido à possibilidade da menor demanda energética, podendo-se trabalhar em temperatura ambiente ou próxima à ambiente. Outro fato importante seria a comparação entre as granulometrias usadas no ensaio 7 (Tyler 1-2 mm), ensaio do ponto central e o ensaio 11 (Tyler 0,25-0,50 mm). Levando-se em consideração a classificação granulométrica do farelo adquirido comercialmente, usada nos referidos ensaios, o ensaio 7 seria interessante já que quantitativamente é a maior fração classificada do farelo produzido, principalmente em termos da possibilidade de implementação do processo em larga escala. A Figura 4.13 apresenta o aspecto do farelo de soja após 120 h de fermentação com o *Penicillium* F58, em diferentes granulometrias.

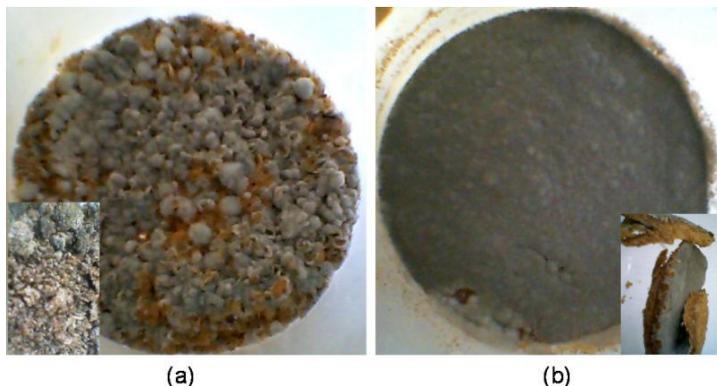


Figura 4.13 - Aspecto do meio de fermentação com *Penicillium* 58F para produção de lipase hidrolítica com farelo de soja na granulometria entre 1 e 2 mm - ensaio 7 (a) e 0,25 e 0,50 mm - ensaio 11 (b).

Pode-se observar que o crescimento do *Penicillium* 58F ocorre visivelmente ao redor das partículas do farelo de soja granulometria entre 1 e 2 mm. Este fato não é evidenciado na Figura 4.13 (b) onde ocorreu compactação do leito de fermentação, devido ao pequeno tamanho das partículas de farelo de soja granulometria entre 0,25 e 0,50, com 75% de umidade. Assim, uma camada do fungo desenvolveu-se preferencialmente no topo do leito de sólidos. O comportamento do ensaio 11 quanto à umidade e granulometria (75% umidade e granulometria entre 1 e 2 mm) foi, de certa forma, peculiar pois apesar da colmatação do leito, um bom desenvolvimento do microrganismo 58F foi evidenciado sendo o resultado de atividade altamente significativo. Este resultado pode estar relacionado com pequena espessura da camada do substrato sólido utilizado na fermentação.

Como observado também por Gervais e Molin (2003), o crescimento da maioria das espécies de fungos filamentosos pode ocorrer na superfície ou entre as partículas do substrato sólido, dependendo da sua porosidade. A aplicação de fungos filamentosos na FES torna-se interessante justamente devido à capacidade de penetração na matriz, pela formação do micélio do fungo no leito do suporte, apresentando relação direta com a velocidade de formação da enzima.

Portanto, para aumentar o desempenho da FES, alguns fatores devem ser ajustados de acordo com a especificidade do microrganismo e o substrato usado, facilitando a formação do micélio, contribuindo para produção da enzima hidrolítica (Couto e Sanromán, 2005; Rahardjo et al., 2005; Raghavarao et al., 2003). Deve se considerar ainda que a

porosidade do leito da fermentação em estado sólido e a área superficial estão diretamente relacionadas com a taxa de oxigênio distribuído e o espaço entre as partículas de substrato.

Geralmente, partículas menores do substrato resultam em uma maior área superficial para o desenvolvimento dos microrganismos. No entanto, pode também resultar na aglomeração do substrato e, desta forma, dificultar o crescimento das células. A compactação pode ainda afetar os processos de transferência de calor e massa, pois, normalmente, o material ou matriz sólida usada na FES possui baixa condutividade térmica naturalmente. Consequentemente, a remoção do calor do processo pode ser baixa por este aspecto. O acúmulo de calor no decorrer da fermentação pode ocasionar a desnaturação das enzimas produzidas, por outro lado, partículas maiores melhoram a aeração do sistema (Holker & Lenz, 2005; Chen et al., 2005; Pandey, 2003). Como neste trabalho se utilizou a fermentação em frascos, estes efeitos atribuídos a meio sólido de baixa granulometria foram minimizados e parecem não ter influenciado a produção da enzima em pequena escala.

Os resultados aqui apresentados mostram que a faixa entre 1-2 mm foi a que apresentou os melhores resultados. Desta forma, esta fração do farelo de soja foi padronizada para realização das etapas posteriores da maximização da produção de lipase hidrolítica.

O fato de esta fração integrar a maior parte do farelo de soja comercializado é um fator que contribui para a economia do processo e facilita o escalonamento, uma vez que reatores industriais com peneiras mais grossas podem ser utilizados, o que de fato é bastante comum. Contudo, ao se considerar a análise estatística (Tabela 4.14), a variável granulometria apresentou influência no processo ($p < 0,1$), somente quando a dosagem da atividade foi realizada em pH 7 em 96 h de fermentação (Tabela 4.15 (b)).

No cultivo de *Aspergillus oryzae* foi verificado que o rendimento da obtenção da enzima estaria diretamente correlacionado com a captação de oxigênio por grama de substrato e consequentemente a ação de enzimas extracelulares na degradação deste substrato depende da sua disponibilidade estrutural. Deve-se considerar ainda que a fração de água solúvel no substrato é que proporcionará a difusão da matriz sólida, viabilizando a ação enzimática e a formação de compostos metabólicos (Godoy et al., 2009; Rahardjo et al., 2005).

O conteúdo de umidade do meio sólido é uma das variáveis mais importantes do processo de fermentação em meio sólido (Pandey et al., 2003). A baixa concentração de água pode dificultar o acesso aos nutrientes, diminuindo o crescimento dos microrganismos. Assim, fica

claro que geralmente a definição de quais microrganismos podem crescer em sistemas de fermentação em estado sólido é determinado pela a_w do substrato sólido (Gutarra et al., 2005; Pandey, 2003; Gervais & Molin, 2003). O impacto do conteúdo de umidade na matriz sólida é definido através das diferenças dos produtos formados na fermentação, pois este afeta a homogeneidade de crescimento da cultura (Chinn et al., 2008).

O alto conteúdo de umidade inicial na matriz sólida da fermentação mostra-se necessário, uma vez que desde o momento do inóculo até o final da fermentação, este diminuirá devido à evaporação acarretada pelo calor metabólico (Chinn et al., 2008; Suryanarayan, 2003). No entanto, alto conteúdo de umidade pode ocasionar a diminuição da porosidade do substrato, limitando os processos de transferência de calor e massa (Gutarra et al., 2005; Pandey, 2003; Mitchell et al., 2003; Mahadik et al., 2002).

A avaliação do efeito da umidade no processo fermentativo indicou que esta influenciou positivamente a produção da lipase em 96 e 120 h de fermentação, evidenciado em todos os pH de dosagens (Tabela 4.15). Desta forma, o conteúdo de umidade usado para maximização da produção de lipase foi aumentado, levando em consideração a condição usada no ensaio 7 (75%). Alguns estudos para produção de lipase em FES indicaram a necessidade de 70% de umidade em suporte inerte (Avincel) (Chinn et al., 2008) em torta de babaçu (Azeredo et al., 2007; Gutarra et al., 2005; Palma et al., 2000), em farelo de soja (Di Luccio et al., 2004) e esterase em bagaço de beterraba (Asther et al., 2002). Em FES com bagaço de cana de açúcar a umidade utilizada foi 75%, alcançando bons resultados de produtividade (Rodriguez et al., 2006). Outros trabalhos como o realizado por Godoy et al. (2009) indicaram que a produtividade aumenta quando a a_w está alta, e diminui quando esta decresce ao longo do processo fermentativo.

A análise estatística do efeito da concentração de esporos na produção da lipase, revelou que este apresentou efeito significativo negativo na dosagem da atividade em pH 9 somente no tempo cinético de 96 h (Tabela 4.15 (c)). Segundo estudo de Godoy et al. (2009), a concentração de inóculo não apresentou efeito significativo ($p < 0,1$) na produção de lipase em FES com resíduo da produção de biodiesel acrescido de óleo de rícino com *Penicillium simplicissimum*. Os níveis avaliados de esporos no inóculo foram $1,0 \times 10^7$ e $1,0 \times 10^8$ esporos/g de substrato. Na presente pesquisa, comportamento similar foi observado, considerando que a variação na concentração de esporos não resultou aumento da produtividade da lipase.

Na produção de lipase com o fungo *Aspergillus niger*, foi utilizado 10^7 esporos/g farelo de trigo (Dutra et al., 2008), bem como neste mesmo substrato fermentado com a cultura de *Gliocladium catenulatum*, 10^6 esporos/g foi inoculado resultando em 138U/g atividade hidrolítica após 120 h de fermentação (Nagy et al., 2006). Já no caso da produção de lipase com *Rhizopus homothallicus*, inoculado com 3×10^7 esporos/g bagaço de cana de açúcar, 10,7U/g de lipase foram obtidos (Rodríguez et al., 2006). Observa-se que os resultados obtidos neste trabalho foram melhores que os alcançados por *Rhizopus homothallicus* e de mesma ordem de grandeza que os registrados por Kamini et al. (1998) e Nagy et al. (2006).

Assim, levando em consideração a quantidade de esporos viáveis durante o processo fermentativo, em etapas posteriores para maximização da produção de lipase hidrolítica a maior concentração de esporos (2×10^8 esporos/g, ensaio 7) foi usado como inóculo. Por questões de praticidade optou-se por utilizar esta concentração, já que é a obtida a partir da suspensão de esporos originada da extração do meio de propagação, evitando etapas de diluição.

A avaliação estatística do efeito da suplementação na produção da enzima hidrolítica indicou influência significativamente negativa da suplementação (UROS), uréia acrescida de óleo de soja em 96 e 120h de fermentação, nas dosagens de atividade em pH 4,0; 7,0 e 9,0. Segundo Rodríguez et al. (2006), a suplementação de bagaço de cana de açúcar, para produção de lipase com o fungo *Rhizopus homothallicus* com adição de 0,8% de uréia ao meio sólido proporcionou aumento da atividade em torno de 6 vezes comparada à suplementação com extrato de levedura como fonte de nitrogênio, sendo este próximo à menor concentração (1%) usada do planejamento, a qual resultou na maior produtividade da enzima.

Assim, nas concentrações de 5,5 e 10% de uréia acrescida de óleo de soja houve a diminuição da produção de lipase. Contudo, deve-se considerar que as concentrações de óleo de soja usadas (18,3 e 33,4%) possam ter contribuído para queda na produtividade, devido a prováveis efeitos inibitórios no processo fermentativo. A adição de 8% de alguns óleos vegetais (milho, oliva, girassol, etc), não causou efeito inibitório na produção de lipase, sendo o óleo de oliva considerado eficiente indutor ao meio de produção. Assim o meio para maximização da produção de lipase neste caso foi 8% óleo de oliva com 0,8% uréia (Rodrigues et al., 2006).

Comportamento contrário foi observado para cultura de *Aspergillus niger* MTCC 2594 suplementado com (5%) de uréia e

alguns óleos vegetais, onde a suplementação não foi eficiente para aumento da produção da lipase, quando comparados ao ensaio controle (Kamini et al., 1998). Já baixas concentrações de óleo de oliva (1%) resultaram no aumento da produção de lipase pela cultura de *Bacillus coagulans*, bem como a maltose e o amido (Alkan et al., 2007), assim como no presente trabalho onde a adição de 3,3% de óleo de soja foi eficiente para aumento da produtividade da lipase com *Penicillium F58*.

A adição de lipídios como fonte adicional de carbono indicou que estes podem também ser usados como fonte de energia, para produção em escala industrial, no caso, o óleo de oliva e milho. A produção de lipase em FES com *Aspergillus niger* 11T53A14 utilizando farelo de trigo indicou a suplementação do meio com resíduo de refinaria de milho, como promissor indutor, resultando em atividade lipásica de 60U/g (Damaso et al., 2008).

Segundo estudo de Vargas et al., (2008) a temperatura de produção da lipase com farelo de soja e *Penicillium simplicicccimum*, as variáveis que mais influenciaram no processo foram a umidade e a temperatura, sendo a última, otimizada em 27°C, e para *Penicillium verrucosum* 27,5°C (Kempka et al., 2008). Para a maximização da produção de lipase hidrolítica optou-se utilizar a menor concentração do suplemento (UROS) usado no PB12 (Tabela 4.14), ensaio 7 (temperatura de 20°C). Considerando que são reportados aos sistemas fermentativos em meio sólido o uso de temperaturas de processo na faixa de 25 a 32°C (Chen et al., 2005; Raghavarao et al., 2003) testou-se nas condições estabelecidas neste ensaio a temperatura de fermentação de 27°C buscando a comparação da produtividade aos 20°C usados no planejamento. A Figura 4.14 apresenta a influência da temperatura de fermentação na produtividade da lipase hidrolítica dosada em pH 4, 7 e 9.

Pode-se observar que em todos os casos foram obtidas as maiores produtividades a 20°C. Em pH neutro obteve-se produtividade de 2,18U/g.h, seguida pelo pH básico (1,90 U/g.h) e ácido (1,45U/g.h). Estes resultados concordam com os obtidos no PB12 (Tabela 4.14) Estudos indicam que aumento da temperatura de incubação causa uma maior diminuição do conteúdo de umidade da matriz sólida, provavelmente devido ao aumento da taxa de absorção pelo microrganismo, bem como do aumento da pressão de vapor no sistema (Di Luccio et al., 2004), contrabalançando o aumento nas taxas de reação com o aumento da temperatura.

Cavalcanti et al. (2005) e Gutarra et al. (2005) verificaram o

aumento da atividade lipase produzida pelo fungo *Penicillium simplicissimum* associada à redução da temperatura de fermentação, sendo esta era dependente do fluxo de ar, no caso de fermentação em colunas de leito fixo. Altas temperaturas de processo associada a atividades proteolíticas podem ocasionar o decréscimo da atividade lipásica. Sendo assim, o tipo de reator define o efeito da temperatura no processo. Este fato está associado à formação de gradientes térmicos, que podem ser radiais e assim resultar em uma diferença de temperatura de até 10°C entre o centro e a parede do fermentador.

Comumente, os mecanismos de transferência de calor gerado durante a fermentação em meio sólido estão relacionados diretamente com a atividade metabólica dos microrganismos. Altas temperaturas afetam a germinação dos esporos, crescimento e formação de produtos, motivando assim, a criação de efetivos sistemas que aumentem a transferência do calor metabólico gerado (Chen et al., 2005; Raghavarao et al., 2003).

Verificou-se pelo teste de Tukey que houve diferença significativa ($p < 0,1$) para as distintas faixas de pH avaliadas, entre a produção de lipase a 20°C e a 27°C, após 96 e 120h de fermentação. A Tabela 4.16 apresenta os dados da atividade hidrolítica obtidas nas temperaturas estudadas.

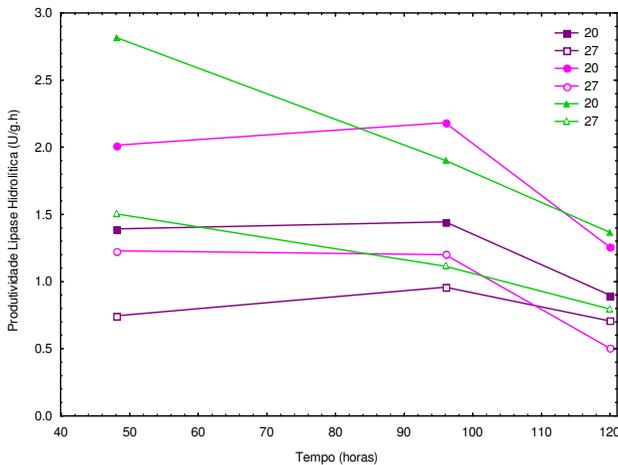


Figura 4.14 - Produtividade da enzima hidrolítica obtida através do processo fermentativo do farelo de soja com *Penicillium* 58F a 20°C e 27°C. Demais variáveis nas condições do ensaios 7 do planejamento experimental Plackett-Burman, □ pH 4, ○ pH 7, △ pH 9.

Tabela 4.16 - Efeito da variação da temperatura de fermentação (20°C e 27°C) na atividade hidrolítica.

Temperatura (°C)	Atividade Hidrolítica (U/g farelo de soja seco)					
	pH 4		pH 7		pH 9	
	96 h	120 h	96 h	120 h	96 h	120 h
20	150,10 ^a ± 2,89	112,89 ^a ± 4,03	234,18 ^a ± 1,31	166,60 ^a ± 2,26	220,29 ^a ± 3,61	170,11 ^a ± 2,34
	89,99 ^b ± 0,46	87,63 ^b ± 0,99	129,56 ^b ± 0,99	63,07 ^b ± 0,13	102,25 ^b ± 1,54	92,92 ^b ± 0,96

Médias ± desvio padrão seguidas de letras diferentes nas colunas, em cada pH, diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Desta forma, para a maximização da produção de lipase hidrolítica, a temperatura foi padronizada em 20°C, considerando que em todos os pHs a temperatura apresentou efeito negativo (Tabela 4.15). Contudo, menores temperaturas de processo poderiam ser inviáveis na produção enzimática. Luo et al. (2006) avaliaram a viabilidade da aplicação de uma nova lipase psicrófila produzida por *Pseudomonas fluorescens*, à temperatura de 20°C, sendo que, uma maior atividade de lipase com uma temperatura ótima menor, pode promover substanciais reduções de consumo de energia do processo.

Microrganismos adaptados ao frio são efetivos produtores de lipases psicrófilas, enzimas que hoje apresentam maior chance em processos biotecnológicos, bioquímicos e microbiológicos, como na indústria de detergentes, alimentos, química fina e processos de biorremediação, bem como na síntese orgânica e de intermediários quirais. Atraem grande atenção em virtude do seu uso em potencial, apresentando alta atividade a baixas temperaturas, característica amplamente desejada para produção de compostos relativamente frágeis. Sendo importante ressaltar que estas lipases apresentam boa estabilidade resultando em alta atividade específica em temperaturas amenas (Joseph et al., 2008; Gerday et al., 2000).

A tendência do uso de baixas temperaturas em processos de lavagem, por razões ambientais e econômicas, tornam o uso de enzimas ativas a temperaturas amenas indispensáveis como aditivos na indústria têxtil, promovendo o aumento da durabilidade de fibras estonadas, e na indústria de alimentos pela preservação de aromas, estruturas (Saisubramanian et al., 2006; Prazeres et al., 2006; Gerday et al., 2000), catálise de componentes instáveis e síntese de compostos orgânicos a baixas temperaturas (Kiran et al., 2008).

As lipases psicrófilas são altamente influenciadas pelos fatores físico-químicos e nutricionais. Gerday et al. (2000) relatam que o uso de óleo de soja como indutor viabilizou produção de lipase com *Acinetobacter* sp. a 4°C, dentre outras, como *Serratia marcescens* crescida a 6°C. No entanto, *Moraxella* sp. também produziu lipase psicrófila a 25°C, temperatura de produção também para as culturas de *Psychrobacter* sp. wp37 e *Pseudoalteromonas* sp. wp27. Neste caso, o aumento da temperatura (>20°C) induziria ao stress da cultura, diminuindo o crescimento celular, bem como baixos níveis de enzima extracelular produzida (Gerday et al., 2000). Alguns fungos também são reportados como produtores de lipase ativa a temperaturas amenas, como *Aspergillus nidulans* (30°C) *Penicillium roqueforti* (Joseph et al., 2008).

4.4.2.2 Estudo das variáveis para produção de lipase utilizando *Penicillium* 58F

Baseado nos resultados obtidos no primeiro planejamento experimental (PB12) foi realizado um segundo planejamento experimental, para melhor investigação dos efeitos e interações entre as variáveis significativas. As variáveis analisadas foram a umidade do farelo e as concentrações de uréia com óleo de soja (UROS), suplementadas ao meio sólido.

A Figura 4.15 apresenta o comportamento cinético da produção de lipases nas condições descritas na matriz do segundo planejamento experimental (Tabela 4.17), avaliadas através da determinação da atividade hidrolítica em pH 4 (a), pH 7 (b), pH 9 (c).

A Tabela 4.17 apresenta a matriz do planejamento com seus valores reais codificados e as respectivas respostas em termos de atividades hidrolíticas obtidas após 96h de fermentação, mensuradas em pH 4, 7 e 9. A temperatura de fermentação foi padronizada em 20°C, a granulometria do farelo de soja entre 1 e 2mm e a concentração de esporos 2×10^8 esporos/g, definidos de acordo com os resultados do planejamento PB12 (Tabela 4.14).

Os dados utilizados na análise estatística foram os de 96 h de fermentação, tempo no qual as maiores atividades hidrolíticas foram obtidas. O ensaio 2 apresentou as maiores atividades hidrolíticas. Sendo estas maiores com o aumento do pH de medida, concretizando a predominância de lipases alcalinas neste pool enzimático.

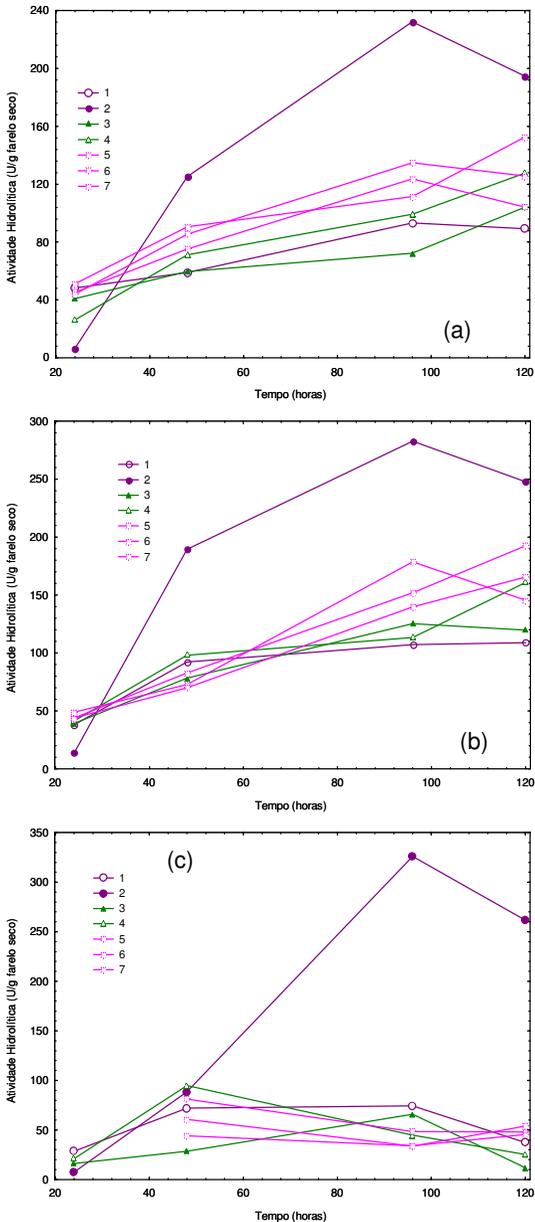


Figura 4.15 - Cinética de produção de lipases hidrolíticas com atividade em (a) pH 4, (b) pH 7 (c) pH 9 nas condições experimentais do segundo planejamento.

Tabela 4.17 - Matriz do segundo planejamento experimental com valores reais e codificados das variáveis, resposta em termos de atividade hidrolítica após 96 h de fermentação.

Ensaio	Condições Experimentais		Atividade hidrolítica(U/g farelo seco)96 h		
	U (%)	[UROS]%	pH 4	pH 7	pH 9
1	-1 (55)	-1 (0,6)	93,27	107,23	74,25
2	+1 (75)	-1 (0,6)	232,25	282,95	325,96
3	-1 (55)	+1 (3)	72,26	125,48	65,84
4	+1 (75)	+1 (3)	99,22	113,48	44,60
5	0 (65)	0 (1,8)	111,42	151,87	48,52
6	0 (65)	0 (1,8)	123,76	178,81	33,76
7	0 (65)	0 (1,8)	134,77	139,64	34,22

A análise estatística resultou em modelos empíricos codificados para a atividade enzimática. Os modelos foram validados pelas análises de variância apresentadas nas Tabelas 4.18 (pH 4) e 4.19 (pH 7). Ambas análises mostraram um alto coeficiente de correlação, 0,98 e 0,96, para pH 4 e 7 e um alto valor do teste-F para a regressão (valores calculados em torno de 6,3 e 2,8 vezes o tabelado, respectivamente). As Equações 4.1 e 4.2 predizem satisfatoriamente a produção de lipase hidrolítica quantificadas em pH 4 e 7.

$$AHpH4 = 123,85 + 41,48 \times U - 38,51 \times UROS - 28,01 \times U \times UROS \quad (4.1)$$

$$AHpH7 = 157,06 + 40,93 \times U - 37,80 \times UROS - 46,93 \times U \times UROS \quad (4.2)$$

Onde, AHpH4 e AHpH7 = atividade lipásica em pH4 e 7 (U/g farelo de soja seco), U = umidade do meio da fermentação (%(p/p)), UROS= suplementação do meio reacional com uréia acrescida de óleo de soja (%(p/p)) para ajuste de relação C/N=6,11.

Tabela 4.18 - Análise de variância para a atividade hidrolítica determinada em pH4

Fontes de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	15953,77	3	5317,92	58,14
Resíduo	274,38	3	91,45	
Total	16228,15	6		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro Puro; F_{3;3;0,95} = 9,27; Coeficiente de correlação: R = 0,98

Os modelos permitiram a construção das superfícies de resposta para atividade hidrolítica, apresentadas na Figura 4.16. As superfícies mostram que para maximizar a produção de lipase é necessário alto teor de umidade (75%) e baixas concentrações de suplemento, UROS (0,6%).

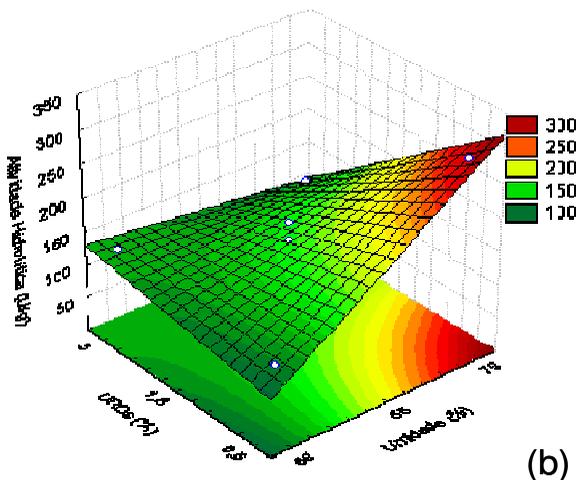
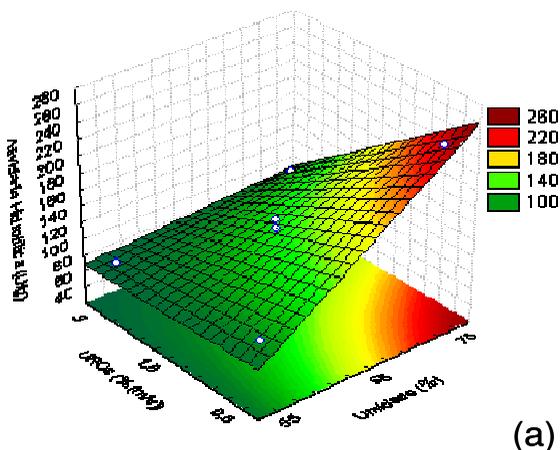


Figura 4.16 - Superfícies de resposta das atividades hidrolíticas determinadas em pH 4 (a) e a pH 7 (b), obtidas em função da umidade (%), e suplementação (uréia acrescida de óleo de soja, UROS %), do farelo de soja, após 96 h de fermentação.

Tabela 4.19 - Análise de variância para a atividade hidrolítica determinada em pH7

<i>Fontes de Variação</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Grau de Liberdade</i>	<i>Quadrados Médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	21226,90	3	7075,63	26,42
Resíduo	803,32	3	267,77	
Total	22030,22	6		

Resíduo = Falta de ajuste + Erro Puro; $F_{3;3;0,95} = 9,27$; Coeficiente de correlação: $R = 0,96$

4.4.2.3 Maximização da produção de lipase *Penicillium 58F*

Para se otimizar a produção de lipase com *Penicillium 58F* foi realizado um terceiro planejamento experimental completo, para identificar uma faixa de níveis mínimos e máximos para produção da enzima, como também na busca de validar um modelo estatisticamente significativo.

Baseado nos resultados obtidos no segundo planejamento experimental, o terceiro planejamento foi realizado nas condições do ensaio 2 (Tabela 4.17). O comportamento cinético dos ensaios realizados no terceiro planejamento experimental (Tabela 4.20) é apresentado na Figura 4.17.

A Tabela 4.20 apresenta a matriz do terceiro planejamento, os níveis das variáveis usadas, seus valores reais e os resultados de atividade enzimática nos pH 4,0; 7,0 e 9,0. A análise estatística foi realizada em 96 e 120 h de fermentação. A análise dos resultados possibilitou a definição de modelos empíricos codificados para as atividades enzimáticas dosadas em pH 7 com 96 e 120 h de fermentação, bem como para o pH 9 em 96 h de fermentação.

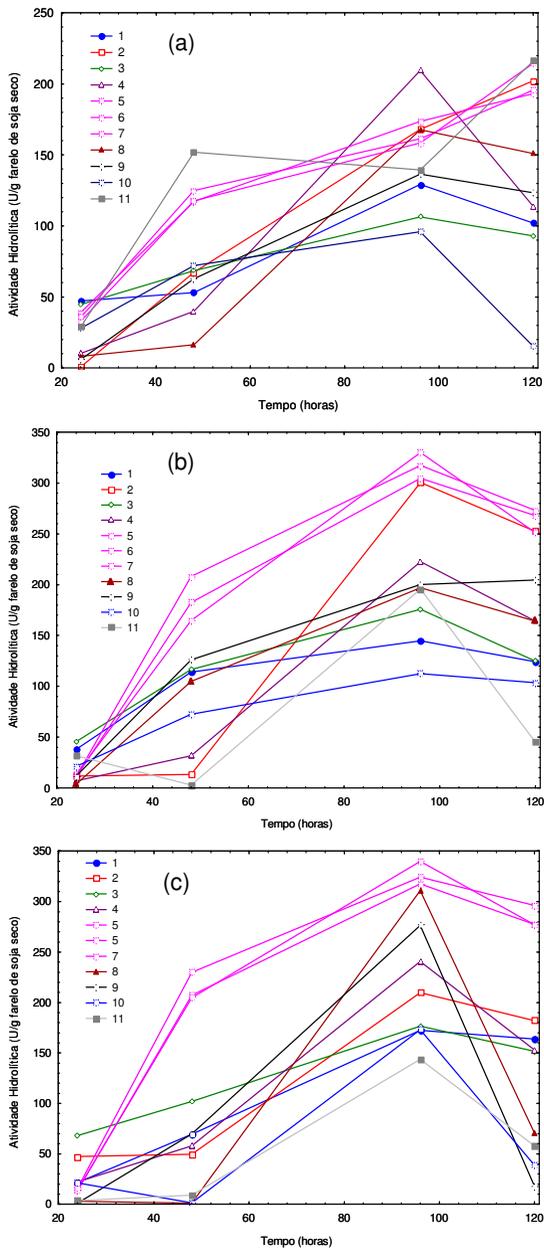


Figura 4.17 - Cinética de produção de lipases hidrolíticas com atividade em (a) pH 4, (b) pH 7 (c) pH 9 nas condições experimentais do terceiro planejamento.

Tabela 4.20 - Matriz do terceiro planejamento experimental completo com 11 ensaios, com as respostas da atividade lipásica nos pH 4, 7 e 9.

Ensaio	U (%)	[UROS] %	Atividade Hidrolítica (U/g farelo seco)96h			Atividade Hidrolítica (U/g farelo seco)120 h		
			pH 4	pH 7	pH 9	pH 4	pH 7	pH 9
			1	-1 (65)	-1 (0,24)	129,30	144,92	172,48
2	+1 (85)	-1 (0,24)	168,05	300,79	209,78	202,25	252,57	182,12
3	-1 (65)	+1 (0,95)	106,38	175,83	176,49	92,86	124,79	151,68
4	+1 (85)	+1 (0,95)	209,49	222,64	240,70	113,77	164,03	152,87
5	0 (75)	0 (0,60)	173,68	330,02	317,68	193,17	251,36	277,45
6	0 (75)	0 (0,60)	158,52	304,68	340,08	214,52	268,11	277,00
7	0 (75)	0 (0,60)	161,55	317,34	324,36	195,65	273,03	296,14
8	0 (75)	-1,41 (0,10)	167,74	197,02	310,90	151,11	164,23	70,50
9	0 (75)	+1,41 (1,10)	136,48	200,17	276,53	123,46	204,62	17,98
10	-1,41 (61)	0 (0,60)	95,90	112,58	173,16	15,19	103,74	38,65
11	+1,41 (89)	0 (0,60)	139,42	195,67	143,68	216,15	45,07	57,70

Os resultados obtidos na análise da atividade em pH 4 com 96 e 120h de fermentação (Tabela 4.20) são apresentados na Tabela 4.21. Com base nesta análise pode-se dizer que o conteúdo de umidade (%) e a suplementação do farelo de soja não influenciaram significativamente ($p < 0,1$) na produção da enzima hidrolítica.

Tabela 4.21 - Efeito das variáveis de processo, estudadas no terceiro planejamento experimental, na produção da lipase hidrolítica após 96 e 120h de fermentação, determinadas em pH 4.

Parâmetros	96h Fermentação				120h Fermentação			
	Efeito	Desvio	t(5)	p	Efeito	Desvio	t(5)	p
Média	164,51	18,92	8,69	0,01	201,11	38,07	5,28	0,01
(1)Temp (L)	24,52	23,21	1,06	0,34	20,57	46,70	0,44	0,68
(2)U(L)	-3,12	27,69	-0,11	0,91	-63,34	55,72	-1,14	0,31
(3)Gran(L)	20,03	23,21	0,86	0,43	46,54	46,70	1,00	0,36
(4)Esporos(L)	-37,77	27,69	-1,36	0,23	-85,08	55,72	-1,53	0,19
(5)UROS(L)	32,18	32,77	0,98	0,37	-39,60	65,94	-0,60	0,57

Os resultados das atividades hidrolíticas obtidas em pH 7 (Tabela 4.20) em 96 e 120 horas possibilitaram a construção dos modelos apresentados nas Equações 4.3 (96 h fermentação), e 4.4 (120h fermentação) em função das variáveis estudadas. Ambas as análises mostraram um alto coeficiente de correlação, 0,79 e 0,92, bons valores do teste-F para a regressão (valores calculados em torno de 1,15 e 3,35 vezes o tabelado, respectivamente). As Equações 4.3 e 4.4 predizem satisfatoriamente a produção de lipase hidrolítica quantificadas em pH 7, Tabela 4.22 (96h) e 4.23(120h).

$$AH_{pH7}(96h) = 304,54 + 25,97 \times U - 44,37 \times U^2 + 8,76 \times UROS - 66,74 \times UROS^2 - 27,26 \times U \times UROS \quad (4.3)$$

$$AH_{pH7}(120h) = 264,02 + 28,16 \times U - 30,53U^2 - 21,39 \times UROS - 85,87 \times UROS^2 - 22,29 \times U \times UROS \quad (4.4)$$

Onde, AH_{pH7} (96h) e AH_{pH7} (120h) = atividade lipásica em pH4 e 7 (U/g farelo de soja seco), U = umidade do meio da fermentação (%(p/p)), UROS= suplementação do meio reacional com uréia acrescida de óleo de soja (%(p/p)) para ajuste de relação C/N=6,11.

Tabela 4.22 - Análise de variância para a atividade hidrolítica determinada em pH 7 após 96 h de fermentação.

<i>Fontes de Variação</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Grau de Liberdade</i>	<i>Quadrados Médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	44194,77	5	8838,95	3,97
Resíduo	11123,49	5	2224,70	
Total	55318,26	10		

Resíduo = Falta de ajuste + Erro Puro; $F_{5;5;0,95} = 3,45$; Coeficiente de correlação: $R = 0,79$

Tabela 4.23 - Análise de variância para a atividade hidrolítica determinada em pH 7 após 120 h de fermentação.

<i>Fontes de Variação</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Grau de Liberdade</i>	<i>Quadrados Médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	53462,49	5	10692,50	11,58
Resíduo	4615,50	5	923,10	
Total	58077,98	10		

Resíduo = Falta de ajuste + Erro Puro; $F_{5;5;0,95} = 3,45$; Coeficiente de correlação: $R = 0,92$

Os modelos permitiram a construção das superfícies de resposta para atividade hidrolítica apresentadas na Figura 4.18. As superfícies mostram que para maximizar a produção de lipase com *Penicillium 58F* é necessário alto teor de umidade (75%) e baixas concentrações de suplemento, UROS (0,6%).

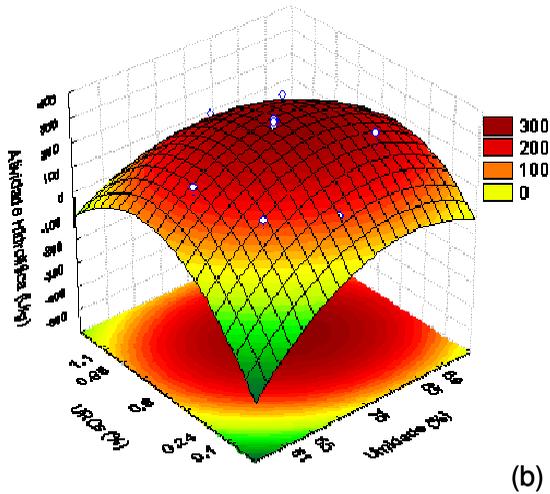
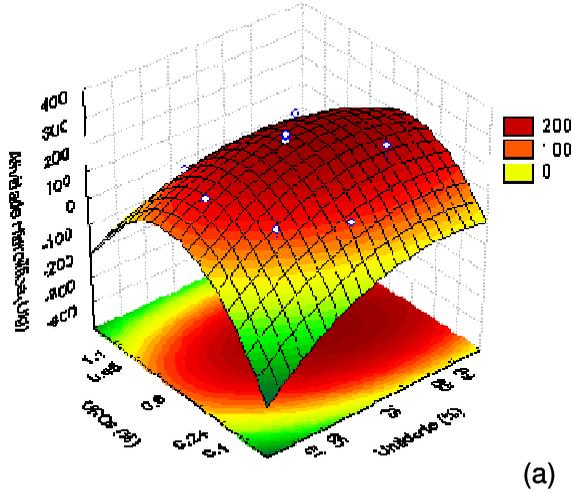


Figura 4.18 - Superfícies de respostas das atividades hidrolíticas determinadas em pH 7 (a) em 96 h fermentação e (b) 120 h fermentação, obtidas em função da umidade (%), e suplementação (uréia acrescida de óleo de soja, UROS %), do farelo de soja.

Os resultados das atividades hidrolíticas obtidas em pH 9 (Tabela 4.20) em 96 h possibilitou a construção do modelo apresentado na Equações 4.5 em função das variáveis estudadas. A análise mostrou um alto R coeficiente de correlação, 0,90, bom valor do teste-F para a regressão (valor calculado em torno de 2,70 vezes o tabelado). A Equação 4.5 prediz satisfatoriamente a produção de lipase hidrolítica quantificada em pH 9 em 96 h Tabela 4.24.

$$AHpH9(96h) = 327,47 + 6,65 \times U - 23,41 \times U^2 - 0,83 \times UROS - 91,46 \times UROS^2 - 6,72 \times U \times UROS \quad (4.5)$$

Onde:

AHpH9 (96h) = atividade lipásica em pH 9 (U/g farelo de soja seco)

U = umidade do meio da fermentação (%(p/p))

UROS= suplementação do meio reacional com uréia acrescida de óleo de soja (%(p/p)) para ajuste de relação C/N=6,11.

Tabela 4.24 - Análise de variância para a atividade hidrolítica determinada em pH 9 após 96 h de fermentação

<i>Fontes de Variação</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Grau de Liberdade</i>	<i>Quadrados Médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	47471,70	5	9494,34	9,28
Resíduo	5115,32	5	1023,06	
Total	52587,02	10		

Resíduo = Falta de ajuste + Erro Puro; $F_{5;5;0,95} = 3,45$; Coeficiente de correlação: $R = 0,90$

O modelo permitiu a construção da superfície de resposta para atividade hidrolítica de lipase de *Penicillium* 58F apresentada na Figura 4.19. Pode-se visualizar a existência de uma região ótima, compreendida entre o teor de umidade por volta de (75%) e concentrações de suplemento em torno de (0,6%).

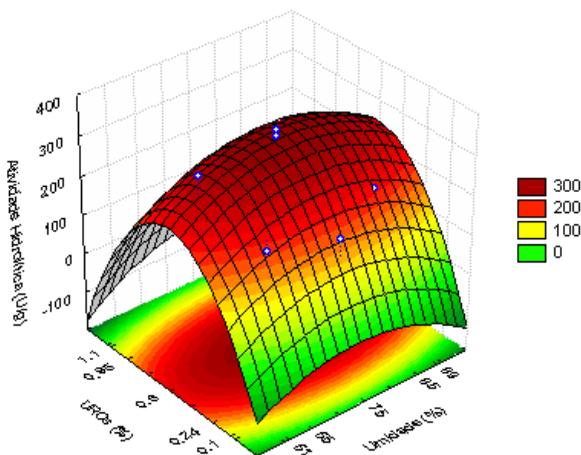


Figura 4.19 - Superfície de resposta da atividade hidrolítica determinada em pH 9 e 96 h fermentação, obtidas em função da umidade (%), e suplementação (uréia acrescida de óleo de soja, UROS %), do farelo de soja.

A análise estatística dos dados obtidos em pH 9 em 120 h de fermentação (Tabela 4.20) avaliou a influência das variáveis conteúdo de umidade (%) e suplementação (uréia com óleo de soja, UROS %) na produção da enzima lipolítica. Os resultados da análise indicaram que as variáveis estudadas não influenciaram significativamente ($p < 0,1$) no processo fermentativo com *Penicillium* 58F.

A condição definida para maximização da produção da enzima lipolítica com *Penicillium* 58F em farelo de soja foi concentração suplemento (0,60% UROS), com C/N fixo em 6,11, conteúdo de umidade 75%, granulometria 1-2 mm, inóculo de 2×10^8 esporos/g e temperatura de 20 °C.

A apresentação de uma região ótima de produção é de extrema importância sob a ótica industrial, pois permite que a produção da enzima seja realizada em uma faixa de concentração dos componentes do meio, permitindo oscilações destas no processo, dentro da área estudada. Tais resultados são interessantes economicamente, também pelo fato de as menores concentrações do terem proporcionado as maiores atividades lipásicas.

4.4.2.4 Resumo da estratégia sequencial dos planejamentos experimentais para otimização da produção de lipase *Penicillium 58F*

A Tabela 4.25 apresenta a evolução da produção das lipases no decorrer do processo de maximização. O ensaio (A) representa as atividades hidrolíticas descritas na Tabela 4.12, representativa ao estudo da seleção do microrganismo e suplementação que demonstrassem potencial produtivo de lipases hidrolíticas, quantificadas nos referidos pH. Considerando os resultados obtidos na referida etapa do estudo, a cepa do *Penicillium 58F* foi selecionada para o estudo cinético e maximização da produção de lipase hidrolítica em farelo de soja suplementado com uréia e óleo de soja (UROS). A dosagem da atividade lipásica foi realizada em pH 4, 7 e 9.

O ensaio (B) representa o primeiro planejamento experimental (PB12) (Tabela 4.14), sendo os resultados descritos os obtidos no ensaio 7, selecionado dentre aos demais do referido planejamento. No segundo (ensaio 2 Tabela 4.17) e terceiro (Tabela 4.20) planejamento experimental (C e D) foram avaliados os efeitos dos diferentes conteúdos de umidade no farelo de soja e das concentrações de suplemento adicionado.

Tabela 4.25 - Acompanhamento da maximização da produção da lipase hidrolítica em farelo de soja e *Penicillium 58F* em 96 e 120 h de fermentação.

Ensaio	Atividade Hidrolítica (U/g farelo de soja seco)							
	96 h		120 h		96 h		120 h	
	pH 4		pH 7		pH 9			
A	116,27	116,79	196,61	203,70	133,56	140,74		
B	201,13	83,79	268,07	176,81	114,78	130,37		
C	232,25	194,77	282,95	247,98	325,96	261,80		
D	164,58	201,11	317,35	264,17	191,43	177,64		

A análise da Tabela 4.25 revela que as atividades avaliadas em cada pH apresentaram comportamentos distintos no decorrer do estudo da produção enzimática. Independentemente do pH, os tempos de 96 e 120h de fermentação foram indicados como pontos cinéticos que maximizaram a produção. Em pH 4 obteve-se atividade máxima de 200 U/g farelo de soja seco após 120 h de fermentação, em pH 7

(317 U/g farelo de soja seco) em 96 h de fermentação. No caso do pH 9, os tempos de fermentação de 96 e 120 h resultaram em atividades de 191 a 177 U/g farelo de soja seco.

A cinética da produção em farelo de soja com *Penicillium* 58F nas condições descritas em cada planejamento não apresentaram entre os ensaios (C) e (D) aumentos expressivos da atividade hidrolítica. Todavia, observou-se na análise dos resultados do segundo planejamento uma tendência de que possivelmente uma nova condição de produção poderia resultar em atividades hidrolíticas mais promissoras.

A análise do terceiro planejamento (D), realizada em 96 h de fermentação apresentou nos pH 7 e 9 modelos empíricos validados, na condição do ponto central do terceiro planejamento (ensaios 5, 6 e 7, Tabela 4.20), conteúdo de umidade 75%, concentração suplemento 0,60%, temperatura de fermentação 20°C, granulometria do farelo de soja em (Tyler 2-1 mm) e inóculo de 2×10^8 (esporos/g).

Deve-se ressaltar que o farelo de soja é um sub-produto da indústria de óleos vegetais, facilmente encontrado na região sul e centro-oeste do país, além é claro do óleo de soja, produto agregado a cadeia produtiva da soja e do biodiesel. A composição do meio indicado como ideal para obtenção de bons níveis de produção enzimática pode ser considerada simples, sendo facilmente disponibilizado em nível industrial.

Diferentes estudos têm indicado que o uso de fonte suplementar de carbono em FES pode favorecer a síntese de diferentes enzimas. De acordo com a aplicação desejada, o meio basal pode ser diferentemente enriquecido para crescimento da cultura e/ou a produção de metabólitos, como as enzimas. O farelo de soja, acrescido de suplementos é indicado em pesquisas anteriores como um resíduo indicado para FES (Kempka et al., 2008; Di Luccio et al., 2004).

Assim, os resultados obtidos na presente pesquisa foram bastante promissores, já que esta cultura demonstrou ser capaz de produzir altas concentrações de lipase extracelular, com potencial hidrolítico, quantificadas em uma ampla faixa de pH (4,7 e 9), revelando características de interesse considerando que Fojan et al. (2000) verificaram máxima atividade lipásica em torno do pH 8 enquanto que para esterases este foi observado próximo a pH6. Portanto, é interessante ainda ressaltar que a atividade das lipases está relacionada à área total do substrato e a faixa de pH ideal está associada com a ativação do sítio catalítico das hidrolases (Fojan et al., 2000).

4.4.2.5 Avaliação do efeito da razão C/N no meio de produção da lipase hidrolítica

A análise dos resultados da influência de diferentes concentrações de carbono e nitrogênio (C/N) do suplemento (UROS) realizado na condição maximizada são descritos na Tabela 4.26. A razão de C/N 6,11 foi utilizada em todos os ensaios descritos anteriormente neste capítulo, concentração do farelo de soja sem suplementação. Assim adicionando-se uréia suplementar foi possível constituir a razão C/N 2,00, bem como no caso do C/N 10,22 a adição de uma massa substancial de óleo de soja, sendo que a composição do outro integrante foi fixada na massa usada para compor o C/N padrão, 6,11.

Tabela 4. 26 - Razão de carbono e nitrogênio no meio de fermentação para produção de lipase hidrolítica em 96 e 120 h de fermentação com *Penicillium 58F*

Concentração (C/N)	Atividade Hidrolítica (U/g farelo de soja seco)							
	96 h		120 h		96 h		120h	
	pH4		pH7		pH9			
2,00	14,86 ^a ± 2,09	25,03 ^a ± 1,76	18,62 ^a ± 6,24	22,03 ^a ± 8,74	14,97 ^a ± 7,88	31,96 ^a ± 6,36		
	197,18 ^b ± 3,45	151,17 ^b ± 0,19	301,26 ^b ± 5,07	246,06 ^b ± 5,95	309,05 ^b ± 2,34	306,20 ^b ± 7,02		
6,11	101,97 ^c ± 0,78	78,77 ^c ± 6,76	165,45 ^c ± 2,68	126,44 ^c ± 0,38	117,25 ^c ± 2,88	118,29 ^c ± 5,47		

Médias ± desvio padrão seguidas de letras diferentes nas colunas e diferentes pH de dosagens, diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0.05$) pelo teste de Tukey.

Verificou-se através do teste de Tukey que nas distintas razão de C/N e faixas de pH avaliadas houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,1$) na produção de lipase. As novas razões testadas (C/N 2,00 e 10,22) não proporcionaram aumento da produtividade. A concentração elevada de nitrogênio resultou nas menores atividades obtidas, possivelmente devido à falta de carbono suficiente para o bom desenvolvimento do microrganismo. Já o acréscimo de óleo de soja como fonte suplementar de carbono, levando a uma relação C/N de 10,22, apresentou bons valores de atividade, na faixa de 101,97 a 165,45 (U/g farelo de soja seco) em 96 h de fermentação. No entanto, estes foram bem inferiores às atividades obtidas em uma relação C/N de 6,11.

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

Assim, ao comparar-se as atividades hidrolíticas obtidas na razão de C/N 6,11 e 10,22 em 96 h de fermentação, em todos os pH avaliados, a relação C/N de 6,11 resultou nas maiores atividades. A queda na produção com a relação C/N 10,22 pode ser devido à repressão da produção pela alta concentração de óleo. É interessante notar como esta relação varia em função do microrganismo utilizado na fermentação. Azeredo et al. (2007) mostram que a relação C/N 13,13 foi a ideal na produção de lipase em FES com *Penicillium restrictum* em torta de babaçu como substrato, com adição de óleo de oliva como fonte suplementar de carbono, levando a um pico de produção em 24 h de fermentação (17,4 U/g). Gombert et al. (1999) evidenciam que o tipo do suplemento influencia na produção de lipase com *Penicillium restrictum* em FES (torta babaçu) de forma mais expressiva que a variação da relação C/N.

A habilidade dos sistemas de fermentação em estado sólido (FES) para vencer a repressão catabólica é provavelmente devido a vários fatores físico-químicos e condições específicas da cultura, resultando assim em grandes níveis de produtividade, bem como, aumento da estabilidade da enzima excretada, além da alta diversidade de composição do meio sólido, em comparação ao líquido (Azeredo et al., 2007). A concentração do suplemento e a densidade do inóculo, por exemplo, resultam em efeito cumulativo no cultivo da *Burkholderia multivarans*, resultando na repressão catabólica deste sistema produtivo de lipase (Gupta et al., 2007).

4.4.2.6 Acompanhamento da atividade proteásica na produção lipase hidrolítica

A produção da enzima protease é encontrada normalmente em grande quantidade na fase estacionária do crescimento microbiano, resultando na diminuição da atividade lipásica. Assim, alterações nas condições de fermentação e composição do meio podem estar aumentando a atividade lipásica no meio de fermentação, com a diminuição da atividade proteásica (Rajendran et al., 2008). As lipases, em contraste às proteases, são ativadas somente quando adsorvidas para a interface óleo-água (Silva et al., 2005). Takaç & Marul (2008) relatam que o tempo necessário para atingir a produção máxima de lipase é dependente do tipo de óleo vegetal usado como suplemento. Contudo, observam que um maior aumento do tempo da fermentação leva à queda da atividade lipásica, independentemente do óleo vegetal usado. Este comportamento foi atribuído à atividade proteásica.

A Figura 4.20 apresenta o comportamento cinético da produção de protease obtidos nos ensaios do Plackett-Burman (PB12). Pode-se observar que os valores de atividade foram baixos quando comparados com a literatura (8,60 U/g) (Palma et al., 2000). A maior atividade proteásica foi de 0,5 U/g farelo de soja seco, descrita no ensaio 2 após 24 h de fermentação com *Penicillium* 58F, nas condições descritas na Tabela 4.14. Nos demais tempos, esta condição também apresentou as maiores atividades proteásicas.

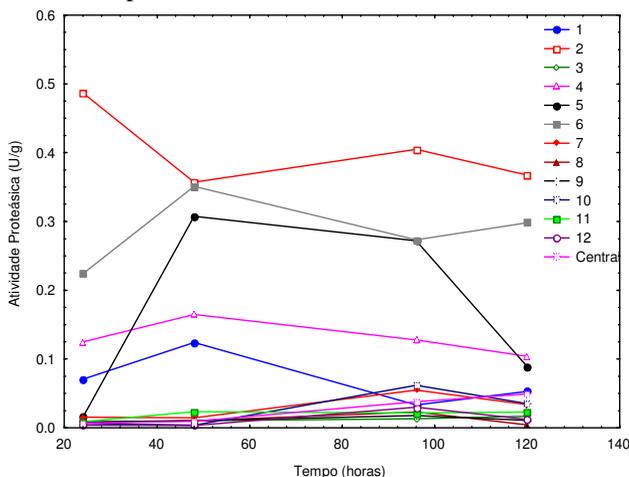


Figura 4.20 - Cinética de produção de protease nas condições do planejamento experimental PB12 pelo *Penicillium* 58F, em farelo de soja.

Na etapa do estudo da suplementação do farelo de soja fermentado com *Penicillium* 58F, suplementado com 1% UROS, a atividade proteásica máxima obtida foi de 0,04 U/g farelo de soja seco em 96 h de fermentação. Na mesma concentração do referido suplemento, avaliada no ensaio 2 do planejamento experimental (Tabela 4.14) a atividade aumentou, sendo praticamente estável durante a cinética. Este comportamento pode ser devido a alterações nas condições envolvidas no processo fermentativo. Estas por sua vez podem alterar a produção dos metabólitos secundários, sendo que a suplementação está diretamente correlacionada à produção de distintas proteínas (Palma et al., 2000).

Atividades proteásicas similares foram observadas em fermentação com farelo de soja por Vargas et al. (2008) utilizando *Penicillium simplicissimum* (0,455 U/g). Com o fungo *Penicillium verrucosum* em 120 h de fermentação obteve-se 0,65U/g de atividade proteásica (Kempka et al., 2008). Os dados de atividade proteásica obtidos nos ensaios que compõe o segundo planejamento experimental (Tabela 4.17) foram altamente inexpressivos, aproximadamente 0,01U/g de farelo de soja seco. O mesmo comportamento foi observado nos dados obtidos através das condições experimentais descritas no terceiro planejamento experimental (Tabela 4.20).

Os baixos valores de atividade proteásica obtidos na presente pesquisa sugerem que o substrato usado, o farelo de soja, possa exercer algum efeito inibitório na produção de proteases, o que pode estar correlacionado com a relação C/N do farelo em comparação a outras matrizes sólidas como a torta de babaçu onde os valores obtidos foram maiores (8,00 a 4,00 U/g) (Palma et al., 2000; Gombert et al., 1999).

Durante o estudo da suplementação ao farelo de soja, o acompanhamento dos níveis de pH no meio de fermentação foi realizado com intuito de rastrear a ação de enzimas proteolíticas. No entanto, o pH permaneceu próximo à neutralidade, o que vem a confirmar as baixas atividades proteásicas, considerando que segundo Palma et al. (2000) a alcalinização do meio de cultura ocorreu juntamente com o incremento da atividade proteásica, devido a possíveis proteólises.

Usualmente ocorre queda na atividade lipásica ao longo da fermentação. No entanto, se a atividade proteásica é baixa, a queda da atividade lipásica ao longo do processo de produção pode ser atribuída à desnaturação pelo calor metabólico gerado durante a fermentação (Cavalcanti et al., 2005).

Mahanta et al. (2008) verificaram que a produção de proteases e lipases em FES usando torta de pinhão manso, através da cultura de

Pseudomonas aeruginosa PseA, demonstrou que em apenas 3 dias de fermentação a atividade proteásica máxima foi encontrada (1818U/g de substrato), decrescendo após este pico da produção, devido a possíveis desnaturações causadas por outros compostos do meio ou pH deste, bem como pela diminuição de nutrientes disponíveis. No caso da atividade lipásica mesmo após 5 dias de fermentação obteve-se 625 U/g de substrato, o meio apresentava residual de ácidos graxos, que podem ter atuado sobre a lipase extracelular produzida.

4.5 Caracterização parcial das lipases produzidas em fes utilizando *Penicillium 58f*

Nesta etapa da pesquisa buscou-se efetuar a avaliação da lipase contida no extrato bruto resultante da FES, frente ao pH e temperatura ótimos e de estabilidade. Foi avaliada ainda a pré-purificação do extrato enzimático através da precipitação com sulfato de amônio e posterior diafiltração. A lipase pré-purificada teve seu comportamento estudado, quanto ao pH e temperatura ótima e de estabilidade e especificidade a diferentes fontes de substrato.

4.5.1. Estudo da extração da enzima

O estudo da influência dos parâmetros envolvidos no processo de extração foi avaliado com a realização de um planejamento experimental completo 2⁴. As variáveis investigadas durante o processo de extração da lipase da matriz da fermentação, foram a temperatura, agitação, pH e razão sólido:líquido, sendo as faixas estudadas descritas no item 3.3.9.1 da sessão Material e Métodos. A Tabela 4.27 apresenta a matriz do planejamento experimental, com os valores codificados e reais do estudo para maximização das condições de extração, e as respectivas respostas em termos de atividades hidrolíticas obtidas após 15 minutos de incubação.

A avaliação estatística dos resultados relativos à extração de lipases hidrolíticas da matriz sólida resultou em um modelo empírico codificado para a atividade lipásica em função das variáveis estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 4.28. A análise mostra um coeficiente de correlação ($R=0,89$) e um alto valor do teste-F para a regressão (valor calculado em torno de 6,0 vezes

o tabelado). A Equação 4.6 representa o modelo codificado que prediz satisfatoriamente a extração de lipase hidrolítica.

Tabela 4.27 - Matriz do planejamento experimental 2⁴ com os valores reais e codificados com as respostas em termos de atividade hidrolítica (após 15 minutos de extração).

<i>Ensaio</i>	<i>T (°C)</i>	<i>Agitação (rpm)</i>	<i>pH</i>	<i>Razão (S/L)</i>	<i>Atividade hidrolítica (U/g)</i>
1	-1 (25)	-1 (50)	-1 (5,5)	-1 (5:20)	85,39 ± 2,35
2	1 (49)	-1 (50)	-1 (5,5)	-1 (5:20)	39,02 ± 2,16
3	-1 (25)	1 (150)	-1 (5,5)	-1 (5:20)	107,81 ± 0,12
4	1 (49)	1 (150)	-1 (5,5)	-1 (5:20)	21,12 ± 1,69
5	-1 (25)	-1 (50)	1 (8,5)	-1 (5:20)	99,90 ± 2,74
6	1 (49)	-1 (50)	1 (8,5)	-1 (5:20)	0,99 ± 1,41
7	-1 (25)	1 (150)	1 (8,5)	-1 (5:20)	114,52 ± 12,71
8	1 (49)	1 (150)	1 (8,5)	-1 (5:20)	0
9	-1 (25)	-1 (50)	-1 (5,5)	1 (1:20)	83,64 ± 10,05
10	1 (49)	-1 (50)	-1 (5,5)	1 (1:20)	68,40 ± 8,48
11	-1 (25)	1 (150)	-1 (5,5)	1 (1:20)	21,43 ± 13,91
12	1 (49)	1 (150)	-1 (5,5)	1 (1:20)	47,40 ± 4,24
13	-1 (25)	-1 (50)	1 (8,5)	1 (1:20)	153,69 ± 15,34
14	1 (49)	-1 (50)	1 (8,5)	1 (1:20)	0
15	-1 (25)	1 (150)	1 (8,5)	1 (1:20)	186,36 ± 25,43
16	1 (49)	1 (150)	1 (8,5)	1 (1:20)	1,26 ± 1,78
17	0 (37)	0 (100)	0 (7,0)	0 (3:20)	96,69 ± 1,53
18	0 (37)	0 (100)	0 (7,0)	0 (3:20)	79,56 ± 0,31
19	0 (37)	0 (100)	0 (7,0)	0 (3:20)	91,63 ± 2,61

$$AHpH7 = 68,36 - 42,16 \times T - 26,87 \times T \times pH + 9,89 \times pH \times S : L \quad (4.6)$$

Onde, AHpH7 = atividade lipásica em pH 7 (U/g farelo de soja seco), T= temperatura de extração (°C), pH= pH do solvente extrator e S:L = razão sólido:líquido.

O modelo permitiu a construção das superfícies de resposta para processo de extração da matriz sólida da lipase com atividade hidrolítica, apresentadas nas Figuras 4.21 e 4.22. Pode-se observar que para maximizar a extração da enzima é necessário a utilização de

menores temperaturas de incubação e nível mais alto de pH do solvente extrator (soluções tampões). Os extratos obtidos nas temperaturas de 37 e 49°C apresentaram baixa atividade enzimática, possivelmente devido à desnaturação da proteína no período de incubação. Kempka et al. (2008) mostraram comportamento semelhante de uma lipase bruta de *Penicillium verrucosum*, demonstrando que as temperaturas de 30 a 45°C em pH 7,0 causavam a queda da atividade hidrolítica da enzima (Kempka et al., 2008).

Tabela 4.28 - Análise de variância para extração da lipase com atividade hidrolítica

<i>Fontes de Variação</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Grau de Liberdade</i>	<i>Quadrados Médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	41556,91	3	13852,30	19,89
Resíduo	10445,29	15	696,35	
Falta de Ajuste	10290,39	13		
Erro Puro	154,90	2		
Total	52002,20	18		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro Puro; $F_{0,95;3;15} = 3,29$; Coeficiente de correlação: $R = 0,89$.

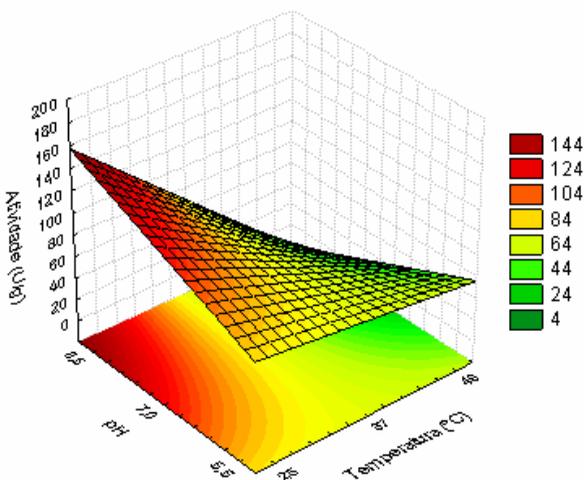


Figura 4.21 - Superfície de resposta da atividade hidrolítica obtida mostrando a interação da temperatura e pH.

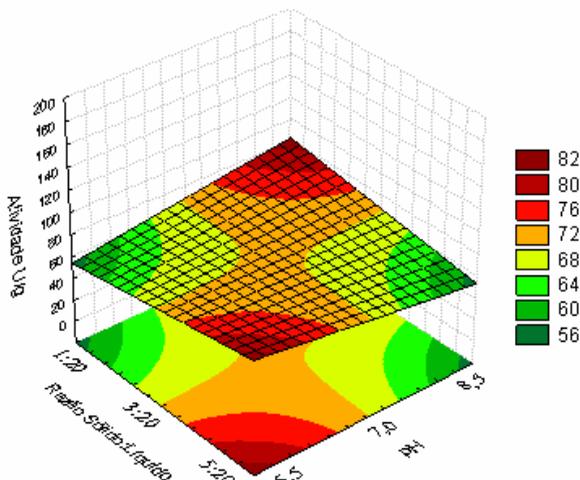


Figura 4.22 - Superfície de resposta da atividade hidrolítica obtida mostrando a interação do pH e razão sólido-líquido.

Na presente pesquisa a temperatura de 25°C utilizada no processo de incubação para extração resultou nas maiores atividades, indicando ser uma variável importante para processo de extração da enzima, apresentando efeito significativo negativo no processo ($p < 0,05$). A faixa de pH do solvente de extração (5,5 a 8,5) estudada revelou ocasionar pequena variação da atividade enzimática, não apresentando efeito significativo ($p < 0,05$). No entanto, a interação do pH com a temperatura apresentou efeito significativo, conforme pode ser observado na Figura 4.21, indicando a importância da variável pH para obtenção de um processo de extração eficiente, preservando a atividade enzimática. O estudo da extração da lipase da matriz de fermentação, farelo de soja, foi realizado por Menoncin et al. (2008) revelando que a extração da lipase de *Penicillium verrucosum* foi maximizada na região de pH entre 6,5 e 8,3 e de temperatura entre 35 e 40°C, sendo considerado ótimo 37°C, pH 7 incubados durante 30 minutos na razão de 1:4 substrato para solvente (tampão fosfato de sódio).

A razão sólido-líquido também não apresentou influência isoladamente no processo de extração, apenas sob interação com pH, conforme demonstrado na Figura 4.22. A razão 5:20 possibilitou maiores atividades, sendo esta também uma característica relevante para etapas de *downstream* do processo. A agitação não apresentou influência no processo de extração. No entanto, sabe-se que se faz

necessária para manter os sólidos suspensos no solvente, aumentando a área de contato das frações (Di Luccio et al., 2004; Vargas et al., 2008), viabilizando o processo de extração.

As condições de realização dos processos de extração são descritos em pesquisas de acordo com as diferentes matrizes de fermentação sólidas usadas nos processos fermentativos. As extrações de lipases da torta de babaçu foram realizadas com tampão fosfato de sódio 100mM (pH7), na razão de 1:5 de sólido para líquido incubados por 20 minutos a 35°C (Cavalcanti et al., 2005; Gutarra et al., 2005) e na razão de 1:4 de sólido para líquido, incubado durante 30 minutos a 37 °C nas pesquisas realizadas por Palma et al. (2000), Gombert et al. (1999) e Azeredo et al. (2007), igual condição foi usada na extração de lipase produzida em farelo de soja (Vargas et al., 2008; Di Luccio et al., 2004) e 35°C incubados durante 30 min (Griebeler et al., 2009; Wolski et al., 2009b).

Para extração da lipase da torta de gergelim foi usado a razão de 1:10 de substrato para solvente (água), igual proporção foi usada para extração de lipase de farelo de trigo, sendo solvente solução de NaCl (1%), incubado a temperatura ambiente durante 2h (Mahadik et al., 2002). Quando bagaço de cana de açúcar foi usado para produção de lipase, a extração da enzima foi realizada com tampão tris-HCl (20mM) pH 8 contendo 0,5% de Triton X-100 e 2mM benzamidina incubadas 40 min a 4°C (Diaz et al., 2006). Para extração do farelo de arroz, usou-se a proporção de 1:6 de substrato para solvente (água), sendo incubado durante 60 min (Colen et al., 2006).

Rodrigues et al. (2006) realizaram estudo da extração da enzima utilizando diferentes solventes, na coluna do fermentador, sendo o fluido e o meio sólido (bagaço de cana de açúcar) mantidos em contato por 40 minutos a 4 °C. A maior atividade enzimática foi obtida quando a solução aquosa de Triton X-100 (0,5%) em pH 8 foi usado como solvente, na proporção de 1:5 sólido para líquido adicionado nas colunas permanecendo em contato durante 40 min a 4°C. Usando água como solvente, Mala et al. (2007) verificaram o efeito da concentração do solvente no processo de extração, sendo a razão 1:10 substrato (farelo de trigo e torta de gergelim) para solvente a razão que resultou maior conversão da atividade. Neste caso a extração foi realizada através do método de percolação, necessitando tempo de contato de 60 min no terceiro estágio de contato, resultando 97% atividade residual.

Considerando os resultados obtidos na análise estatística do planejamento experimental, realizou-se o estudo cinético da extração da

lipase. A condição usada foi temperatura de 25°C, 150 rpm e razão sólido:líquido de 5:20. Em função da maior estabilidade de lipases microbianas em pH neutro (Lima et al., 2004), e da pequena diferença obtida na extração entre os demais pH estudados e pH neutro, optou-se por utilizar pH 7 para as demais extrações.

A cinética da extração da enzima, visualizada na Figura 4.23, foi realizada em 0, 15, 30, 45 minutos, através do método de múltiplo contato. A eficiência do processo de extração da enzima da matriz de fermentação sólida é questão limitante às técnicas de *downstream* do processo, vinculada à origem do extrato, considerada uma etapa crítica para obtenção de enzimas microbianas purificadas (Mala et al., 2007). Na presente pesquisa observa-se que aproximadamente 50% da extração da enzima ocorreram nos primeiros minutos do processo. Este comportamento se deve provavelmente ao fato de a enzima estar concentrada na superfície das partículas, resultando em uma rápida extração da matriz sólida.

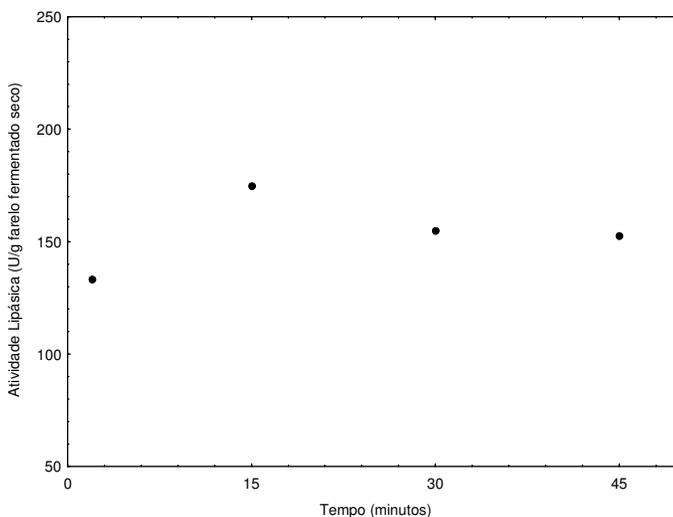


Figura 4.23 - Cinética de extração da enzima do farelo fermentado.

Algumas pesquisas mostram que a formação do micélio aéreo do fungo está diretamente relacionado com a velocidade de formação da enzima (Rahardjo et al., 2005) que pode assim encontrar-se na superfície da matriz sólida, considerando ainda que partículas menores do

substrato possam resultar em uma maior área superficial para o desenvolvimento dos microrganismos (Couto e Sanromán, 2005).

Na presente pesquisa a atividade lipásica máxima obtida foi de 175,0 U/g farelo fermentado seco, em 15 minutos de extração, usando como solvente o tampão fosfato de sódio 100 mM na razão de 5:20 de farelo fermentado para solvente, a 25°C e 150 rpm.

4.5.2 Pré-purificação do Extrato Enzimático

Os resultados obtidos de atividade específica na etapa de precipitação do extrato enzimático de *Penicillium* 58F podem ser visualizados na Tabela 4.29. O presente estudo revelou fator de purificação de 1,48 após a técnica de precipitação. Utilizando 70% saturação, a lipase de *Antrodia cinnamomea* e a de *Bacillus* sp. RSJ-1 apresentaram fator de purificação de 1,2 (Shu et al., 2006) e 12,5 (Sharma et al., 2002).

A técnica de precipitação das proteínas com sais é considerada uma ferramenta importante para concentração de proteínas. O processo de concentração promove a separação das proteínas da maioria dos demais compostos do meio, facilitando os processos subsequentes (Martins, 2001). A concentração pela adição de sais, como sulfato de amônio, baseia-se no aumento da força iônica, de tal forma que as moléculas protéicas se agregam e precipita (Borzani *et al.*, 2001). Assim, de acordo com os resultados obtidos no estudo da precipitação da lipase de *Penicillium verrucosum*, a saturação de 60% com sulfato de amônio e 5 horas de precipitação (Menoncin et al., 2008) foram usados no presente estudo. A faixa de concentração de 60-70% de saturação foi descrita como adequada para precipitação de enzimas produzidas com diferentes microrganismos e substratos (Sun et al., 2008; Shu et al., 2006; Kanwar, et al., 2006; Sharma, et al., 2002; Prazeres, et al., 2006).

No caso da lipase de *Pseudomonas* sp. (MSI057) a precipitação foi realizada com 80% de saturação, resultando em fator de purificação de 6,62. Com atividade específica de 0,99 U/mg as propriedades da enzima purificada foram avaliadas, principalmente o efeito da adição de diferentes íons na atividade da lipase, sendo os íons Zn^{2+} e Co^{2+} considerados ativadores (Kiran et al., 2008).

Tabela 4.29 - Acompanhamento do comportamento do extrato enzimático hidrolítico durante as etapas de pré-purificação.

	Atividade Hidrolítica (U/mL)	Proteína(m g/mL)	Atividade específica(U/mg)
Extrato bruto	12,00	2,80	4,28
Extrato Precipitado	16,11	2,54	6,32
Extrato diafiltrado	17,85	3,00	6,13

De acordo com estudos apresentados na literatura, a precipitação de lipases com sulfato de amônio em distintas concentrações variam de acordo com as referidas pesquisas. As concentrações indicadas variam de 80% a 20% de saturação do sal. Para lipases produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* (Karadzic et al., 2006), *Pseudomonas fluorescens* (Makhzoum et al., 1995) e *Aspergillus niger* (Carvalho et al., 2005), foi usada a concentração de sulfato de amônio de 80% de saturação. Algumas lipases foram ainda precipitadas com 70% de saturação, como a de *Antrodia cinnamomea* (Shu et al., 2006) e *Bacillus sp.*RSJ-1 (Sharma et al., 2002); 60% a de *Bacillus coagulans* MTCC-6375 (Kanwar et al., 2006) e *Antrodia cinnamomea* (Shu et al., 2006); 40% para a de *Clostridium tetanomorphum* (Petersen e Daniel, 2006) e 20% a proveniente de *Favobacterium odoratum* (Labuschagne et al., 1997).

A diafiltração foi realizada com a passagem de duas vezes o volume de extrato adicionado a célula, volume este descrito em outras pesquisas que relatam a purificação de lipases microbianas (Baron et al., 2005; Maria et al., 2002), bem como em bibliografia que descreve o uso e eficiência do procedimento de diafiltração (Zeman & Zydney, 1996). Nesta etapa buscou-se lavar e eliminar solutos indesejáveis da amostra de proteínas, com intuito de aumentar a atividade específica da enzima de interesse (Wang, 2001; Zeman & Andrew, 1996).

Os resultados do extrato diafiltrado, apresentados na Tabela 4.28, indicaram redução de 0,97 vezes de atividade específica. Assim, verificou-se que o processo de diafiltração não resultou aumento do fator de purificação, comportamento similar ao observado por Menoncin et al. (2008) onde a etapa de diálise não foi efetiva para aumento da atividade específica de lipase de *Penicillium verrucosum*.

4.5.3 Determinação da Temperatura e pH Ótimos

4.5.3.1 Extrato bruto

Foi realizada a determinação dos valores de temperatura e pH ótimos do extrato enzimático bruto produzido por *Penicillium* F58 em condição não otimizada da fermentação. A avaliação da influência do pH (5,0; 7,0; 8,0) na dosagem da atividade foi realizada a 37°C em incubador rotatório durante 15 minutos, considerando as condições utilizadas em estudos anteriores usando farelo de soja com *Penicillium simplicissimum* (Vargas et al., 2008; Di Luccio et al., 2004) e com *Penicillium verrucosum* (Kempka et al., 2008).

Tabela 4.30 - Efeito do pH na atividade do extrato enzimático bruto produzido por *Penicillium* 58F.

Valor pH	Atividade Relativa (%)
5,0	60,25 ± 1,49 ^b
7,0	100,00 ± 0,79 ^a
8,0	98,65 ± 0,70 ^a

Médias ± desvio padrão seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os resultados apresentados na Tabela 4.30 possibilitaram a análise para determinação do pH ótimo para determinação da atividade enzimática. Através do teste de Tukey verificou-se que o pH 7 e pH 8 (tampão fosfato de sódio 100 mM) apresentaram atividades estatisticamente iguais ($p < 0,05$). Efeito equivalente foi observado para lipase bruta de *Penicillium verrucosum* produzida em farelo de soja, onde encontrou-se pH 7 como ótimo (Kempka et al., 2008).

A literatura reporta que o pH neutro é geralmente definido como ótimo para atividade lipásica (Benjamin & Pandey, 2000), bem como a temperatura de aproximadamente 37°C (Burkert, 2004; Freire et al., 1997; Benjamin e Pandey, 2000). Para a lipase bruta de *Antrodia cinnamomea* a temperatura de 60°C e pH 11 foram determinados como ótimos para reação (Lin e Ko, 2005). A temperatura ótima de 45°C foi encontrada para lipase bruta de *Aspergillus niger* produzida em farelo de trigo (Mahadik et al., 2002). O estudo da temperatura e pH ótimo para lipase bruta de *Geotrichum* R59 revelou duas temperaturas ótimas, 37 e

50°C, sugerindo que a cultura possa produzir múltiplas formas de lipases (Ginalska et al., 2004). Comportamento semelhante foi obtido no presente trabalho, em relação ao pH ótimo.

A Tabela 4.31 apresenta os resultados de temperatura ótima para determinação da atividade enzimática. Observou-se que a maior atividade foi obtida na temperatura de 37°C, sendo significativamente diferente ($p < 0,05$) das obtidas a 47 e 27 °C. Os resultados obtidos nesta pesquisa são semelhantes aos obtidos com *Penicillium simplicissimum* (Vargas et al., 2008; Di Luccio et al., 2004) e *Penicillium verrucosum* (Kempka et al., 2008) também em farelo de soja. Para a produção de lipase por FES, utilizando *Penicillium simplicissimum* e torta de babaçu como substrato, o pH e a temperatura ótima foram 37°C, pH 7 (tampão fosfato de sódio 100mM) respectivamente (Gutarra et al., 2005), bem como para lipase bruta de *Aspergillus niger* MTCC 2594 produzida em FES com torta de gergelin temperatura ótima definida, 37°C e valor ótimo de pH 7 (Kamini et al., 1998).

Tabela 4.31 - Efeito da temperatura na atividade do extrato enzimático bruto produzido por *Penicillium* 58F.

Temperatura (°C)	Atividade Relativa (%)
27	91,45 ± 0,93 ^c
37	100,00 ± 0,74 ^b
47	95,56 ± 0,70

Médias ± desvio padrão seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

4.5.3.2 Extrato pré-purificado

Foi realizada a determinação dos valores de temperatura e pH ótimos do extrato enzimático pré-purificado liofilizado de *Penicillium* F58. A reação foi realizada a 37°C e pH 7 (tampão fosfato de sódio 100 mM) em incubador rotatório por 15 minutos, considerando os resultados do estudo anterior de temperatura e pH ótimo da atividade enzimática da enzima bruta. A avaliação da influência do pH de dosagem da atividade foi realizada usando uma faixa maior de pH (3,0 a 10,0).

Os resultados descritos em Anexo Tabela 7.2 foram analisados através do teste de Tukey possibilitando a verificação de que não houve

diferença estatisticamente significativa ($p < 0,1$) na atividade lipásica medida em pH 9 (tampão Tris-HCl 100 mM) e 10 (tampão glicina-NaOH 100 mM). Este comportamento pode ser observado na Figura 4.24, sendo que o aumento crescente da atividade relativa ocorre à medida em que o pH aumenta.

Em pH neutro foi obtido aproximadamente 90% da atividade obtida em pH básico. Em estado bruto, esta enzima apresentou maior atividade em pH 7. Cabe ressaltar que atividade de 400U/g foram obtidas em pH básico, sendo a maior atividade reportada até o momento em FES de farelo de soja foi 40U/g com *Penicillium verrucosum* (Kempka et al., 2008), bem como superior à maioria dos trabalhos de produção de lipases por FES reportados na literatura com atividades em torno de 17,4U/g (Azeredo et al., 2007), 26,40 U/g (Cavalcanti et al., 2005), 30,3U/g (Gombert et al., 1999) e 27,8 U/g torta de babaçu (Palma et al., 2000), 363U/g torta de gergelim pura e 384 U/g com torta de gergelim misturada a farelo de trigo (Mala et al., 2007).

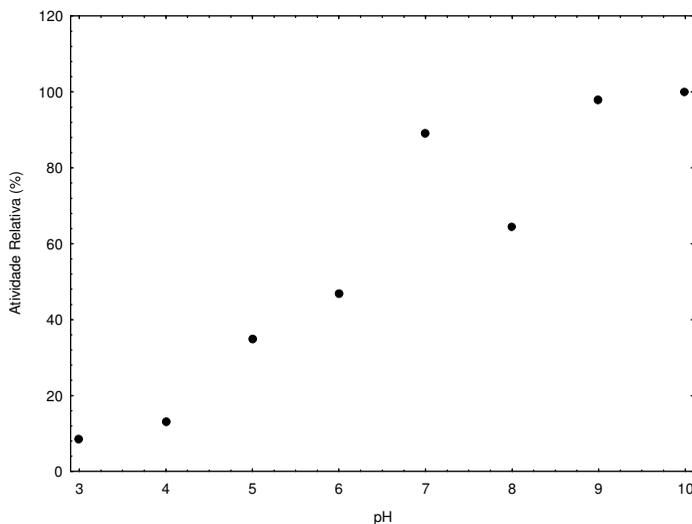


Figura 4.24 - Efeito do pH na atividade hidrolítica da lipase pré-purificada produzida por FES com *Penicillium* 58F

Considerando que o pH 9 foi utilizado da etapa de comparação das cepas selecionadas para produção de enzimas hidrolíticas (58F e 74F), bem como que as maiores atividades relativas foram obtidas nesta condição. As dosagens de atividade nos ensaios subsequentes foram

realizadas em pH 9. Comparando o valor de pH ótimo obtido neste trabalho, pode-se observar que este está dentre os valores indicados na literatura, para outras lipases (pH 5 a 9) (Burkert et al., 2004; Freire et al., 1997; Tan et al., 2003; Benjamin & Pandey, 2000; Martins, 2001; Prazeres et al., 2006).

De acordo com o resultado do pH ótimo de dosagem, a temperatura ótima foi avaliada na faixa de 20 a 45°C em incubador rotatório, dosada em pH 9. Os resultados descritos em Anexo na Tabela 7.2 foram analisados através do teste de Tukey. Verificou-se que a temperatura de incubação de 37°C resultou na maior atividade (Figura 4.25), sendo estatisticamente diferente ($p < 0,05$) das demais. É importante ressaltar que as temperaturas de 25, 30, 40 e 45°C não apresentaram entre si, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), sendo que a atividade nestas temperaturas ficaram em torno de 80 a 90% da atividade máxima.

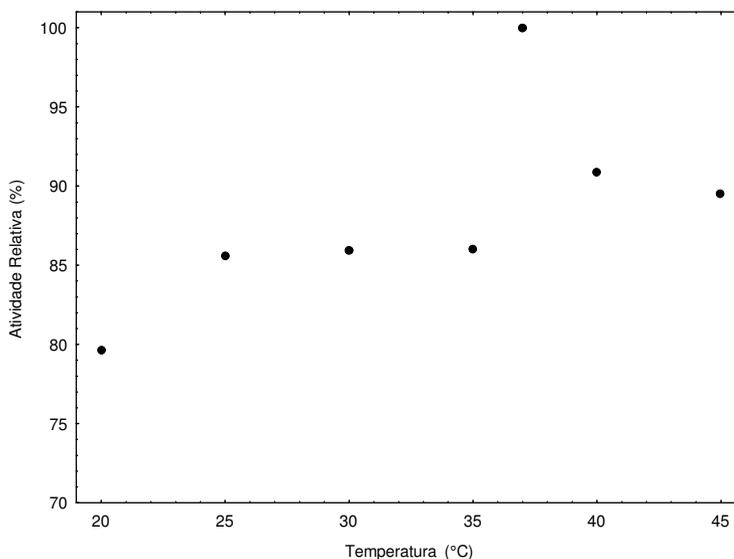


Figura 4.25 - Efeito da temperatura na atividade hidrolítica da lipase pré-purificada produzida por FES com *Penicillium 58F*.

Através dos resultados obtidos quanto à temperatura e pH ótimos de atividade da lipase pré-purificada, foi realizada a avaliação do tempo de incubação. A dosagem da atividade lipásica foi realizada em meio reacional a pH 9 (Tampão Tris-HCl 100mM) incubado a 37°C nos tempos (0, 15 e 30 minutos) de incubação.

O resultado com 15 minutos de incubação resultou na atividade lipásica mais expressiva (356,30 U/g) em comparação a atividade de 227,80 U/g para 30 minutos de incubação. O tempo zero da reação foi preparado e incubado até temperatura constante (37°C), então a amostra da enzima adicionada e em seguida a adição de acetona/etanol (1:1) para que a reação fosse paralisada.

4.5.4 Avaliação da Estabilidade do Extrato Hidrolítico Bruto

4.5.4.1 Avaliação da estabilidade ao pH

O extrato enzimático bruto obtido utilizando *Penicillium* F58 foi incubado em diferentes valores de pH, acompanhando comportamento em função do tempo. O extrato foi ressuspenso em tampões com valores de pH variando de pH 5,0 e 5,5 (tampão acetato de sódio 250mM); 7 e 8,5 (tampão fosfato de sódio 250mM), e 9,0 (tampão Tris-HCl 250 mM) permanecendo incubado a 35°C. Amostras de cada ensaio foram coletadas no t(0) e t(60min) para determinação da atividade hidrolítica (3.3.3.1).

Os resultados obtidos durante a avaliação da estabilidade aos valores de pH são apresentados na Tabela 4.32. A lipase produzida através da FES apresentou maior estabilidade em pH 7. Freire et al. (1997) mostram que a lipase de *Penicillium restrictum* é estável na faixa de pH 7 a 8, assim como Kempka et al. (2008), que demonstram que a lipase de *Penicillium verrucosum* foi mais estável em pH 6-7. Já a produzida em FES com *Aspergillus niger* apresentou maior estabilidade na faixa de pH 5-7 durante 24 horas à temperatura ambiente (Mahadik et al., 2002). A lipase bruta de *Aspergillus niger* MTCC 2594 produzida em FES com torta de gergelim é estável em ampla faixa de pH 4-10 (Kamini et al., 1998). Por outro lado, a enzima bruta de *Aspergillus niger* MYA 135 produzida em FS apresentou estabilidade na faixa de pH 7-10 (Romero et al., 2007).

Tabela 4.32 - Influência do pH na estabilidade do extrato enzimático bruto obtido em por FES com *Penicillium* 58F.

<i>Valor pH</i>	<i>Atividade Residual (%)</i>
5,0	61,91 ± 2,70 ^b
5,5	70,49 ± 4,04 ^b
7,0	88,31 ± 4,31 ^a
8,5	59,65 ± 6,14 ^b
9,0	68,25 ± 2,46 ^b

Médias ± desvio padrão seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

4.5.4.2 Avaliação da estabilidade térmica

A avaliação da estabilidade da lipase do extrato bruto foi realizada incubando esta em diferentes temperaturas, acompanhando comportamento em função do tempo. O extrato foi ressuspenso em tampões pH 7 (tampão fosfato de sódio 250mM), permanecendo incubado nas temperaturas avaliadas (27, 37, 47, 57 e 67 °C). Amostras de cada ensaio foram coletadas no t(0min) e t(60min) para determinação da atividade hidrolítica (3.3.3.1). Os resultados obtidos durante a avaliação da estabilidade são apresentados na Tabela 4.33. Os resultados foram analisados através do teste de Tukey, sendo a temperatura de 27 °C a que resultou em maior atividade residual de 94 %. As demais temperaturas resultaram em baixas estabilidades para lipase bruta do *Penicillium* F58, sendo estas estatisticamente diferentes da temperatura de 27 °C ($p \leq 0,05$).

Tabela 4.33 - Influência da temperatura na estabilidade do extrato enzimático bruto obtido em sistema de FES com *Penicillium* 58F.

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Atividade Residual (%)</i>
27	94,46 ± 2,33 ^a
37	47,41 ± 4,35 ^b
47	21,36 ± 0,53 ^c
57	14,32 ± 0,34 ^{c,d}
67	10,26 ± 1,54 ^{c,d}

Médias ± desvio padrão seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os valores de estabilidade térmica do extrato enzimático bruto obtidos neste trabalho são próximos aos reportados por Lima et al. (2004) para lipase bruta produzida em FS com *Penicillium aurantiogriseum*, 28 °C, sendo a faixa avaliada até 50 °C, Kempka et al. (2008) verificou maior estabilidade a 35 °C do extrato lipolítico bruto de *Penicillium verrucosum*. A lipase de *Aspergillus niger* MYA 135 produzida em FS apresentou faixa de estabilidade de 25 a 40°C (1 hora) (Romero et al., 2007).

Pesquisas relatam que a estabilidade térmica da enzima pode estar relacionada com sua estrutura, e pode ser influenciada por fatores como, pH e íons metálicos, por exemplo. Alguns autores indicam que a estabilidade térmica de uma enzima pode ser melhorada na presença de alguns cátions como Ca²⁺, Na⁺, entre outros (Sharma et al., 2001). Em alguns casos, a estabilidade térmica de muitas lipases pode ser aumentada através do uso de técnicas de imobilização da enzima (Sharma et al., 2001).

4.5.5 Avaliação estabilidade do extrato hidrolítico pré-purificado

4.5.5.1 Avaliação da estabilidade ao pH

A avaliação da estabilidade da lipase pré-purificada liofilizada foi realizada incubando esta em diferentes valores de pH, acompanhando comportamento em função do tempo. O extrato foi ressuspenso em tampões com valores de pH variando de pH 3, 4 e 5 (tampão acetato de sódio 250 mM); 6, 7 e 8 (tampão fosfato de sódio 250 mM), 9 (tampão Tris-HCl 250 mM) até 10 (tampão glicina 250 mM), permanecendo incubado a 35°C. Amostras de cada ensaio foram coletadas no início e após 60 min de incubação para determinação da atividade hidrolítica (3.3.3.1).

Os resultados obtidos durante a avaliação da estabilidade aos valores de pH são apresentados na Tabela 4.34. Os dados foram analisados através do teste de Tukey considerando ($p \leq 0,05$). A lipase pré-purificada apresentou maior valor de estabilidade a pH 7, apresentando atividade residual de 98%, sendo igual estatisticamente a obtida em pH 10 (91%). Este resultado vem de encontro ao obtido para o extrato bruto. A estabilidade da enzima pré-purificada em relação à bruta demonstrou aumento em torno de 60%, possivelmente devido à retirada de impurezas contidas junto aos compostos de interesse.

Tabela 4.34 - Avaliação da influência do pH na estabilidade do extrato enzimático pré-purificado

<i>pH</i>	<i>Atividade Residual (%)</i>
4	81,62 ± 0,65 ^c
5	67,65 ± 1,64 ^d
6	82,18 ± 2,10 ^c
7	98,22 ± 1,31 ^a
8	82,06 ± 2,66 ^c
9	88,00 ± 2,83 ^{b,c}
10	91,80 ± 1,69 ^{a,b}

Médias ± desvio padrão seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

O comportamento da enzima pré-purificada em pH 9 revelou atividade residual relevante, em torno de 88% sendo esta estatisticamente igual a obtida em pH 10. Contudo a estabilidade obtida em pH 9, pH 8, 6 e 4, caracteriza uma faixa de estabilidade, sugerindo a existência de lipases ácidas, neutras e alcalinas no extrato produzido. Saxena et al. (2003b) verificaram que a lipase purificada de *Aspergillus carneus*, produzida por FS, demonstrou maior estabilidade nos valores de pH 8-10.

O emprego da técnica de precipitação com sais, aplicada como pré-tratamento do meio resultou na melhoria da estabilidade das proteínas de interesse, ressaltando, desta forma, a importância da aplicação de técnicas de concentração de proteínas, para separação das mesmas de outros compostos do meio, eliminando possíveis interferentes (Martins, 2008).

4.5.5.2 Avaliação da estabilidade à temperatura

A avaliação da estabilidade da lipase pré-purificada liofilizada foi realizada incubando esta em diferentes temperaturas, acompanhando-se o comportamento em função do tempo. O extrato foi ressuspensionado em pH 7 (tampão fosfato de sódio 250 mM), permanecendo incubado nas temperaturas avaliadas (20, 25, 30, 37 e 45 °C). Amostras de cada ensaio foram coletadas no início ($t=0$) e após 60 min de incubação para determinação da atividade hidrolítica (3.3.3.1).

Os resultados obtidos durante a avaliação da estabilidade são

apresentados na Tabela 4.35. Os dados foram analisados através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$), revelando que a lipase pré-purificada apresentou maior estabilidade entre 27 e 30°C, com atividade residual em torno de 100%.

Tabela 4.35 - Avaliação da influência da temperatura na estabilidade do extrato enzimático concentrado

Temperatura (°C)	Atividade Residual (%)
20	71,60 ± 6,12 ^b
27	100,00 ± 3,16 ^a
30	91,01 ± 2,51 ^{a,b}
37	39,35 ± 1,91 ^c
45	35,90 ± 0,73 ^c

Médias ± desvio padrão seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Em estudo realizado por Burkert et al. (2004), com lipase obtida de *Geotrichum candidum* NRRL-Y552, a estabilidade foi reduzida quando a temperatura era elevada a níveis superiores a 30°C. Temperaturas de estabilidade maiores foram relatadas para lipase produzida por *Rhizopus homothallicus* que apresentou tempo de meia-vida ($t_{1/2} = 0,72$ h) a 50°C (Diaz et al., 2006), e para lipase de *Aspergillus niger* sendo 40°C a temperatura na qual esta apresentou maior estabilidade (Kamini e Mala., 1998). A lipase purificada de *Aspergillus carneus*, produzida por FS, demonstrou maior estabilidade a temperatura de 30-50°C (Saxena et al., 2003b). Considerando esta faixa, pode-se citar a estabilidade térmica obtida para enzima bruta de *Candida rugosa* (UAB) e de uma mistura de isoenzimas comerciais, a 30°C (Casa et al., 2006).

4.5.5.3 Avaliação da estabilidade ao cálcio

O efeito do cálcio na estabilidade da lipase pré-purificada é apresentado na Tabela 4.36. A lipase pré-purificada foi submetida durante 60 minutos a concentrações variadas de CaCl_2 (0,1; 0,5 e 1,0 %), sendo um controle realizado sem a adição do sal. O tampão fosfato de sódio (250mM) foi utilizado para dissolução do sistema. Amostras de

cada ensaio foram coletadas no início ($t=0$) e após 60 min de incubação para determinação da atividade hidrolítica (3.3.3.1).

Os dados obtidos foram analisados através do teste de Tukey, considerando $p \leq 0,05$. O comportamento observado em relação ao aumento da concentração de cálcio ao qual a lipase pré-purificada foi submetida revelou que a medida que a concentração do sal aumentava, a atividade residual decrescia em comparação ao ensaio controle, indicando possível inibição ou desnaturação da enzima pelo sal de cálcio. Apesar de alguns autores mostrarem o efeito benéfico do cálcio em algumas lipases (Nawani e Kaur, 2007; Kojima e Shimizu, 2003), outros trabalhos também observaram inativação de lipase quando expostas a meio contendo cálcio (Menoncin et al., 2008; Kiran et al., 2008; Diaz et al., 2006).

Tabela 4.36 - Influência dos sais de CaCl_2 na atividade da lipase pré-purificada

<i>Concentração CaCl_2 (%)</i>	<i>Atividade Residual (%)</i>
0 (Controle)	$100,00 \pm 2,58^a$
0,1	$86,00 \pm 2,99^b$
0,5	$57,12 \pm 2,42^c$
1,0	$23,32 \pm 4,84^d$

Médias \pm desvio padrão seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Wang et al. (2009) avaliaram a adição de Ca^{2+} sobre atividade residual de duas lipases purificadas produzidas por *Pseudomonas monteilli* TKU 009 em FS, após 60 min de incubação a 25°C . A F1 apresentou 30% de atividade residual enquanto a lipase F2 131%, sendo portanto a lipase F2 identificada como cálcio dependente. Já a lipase F1, da mesma forma que na presente pesquisa, em concentrações de CaCl_2 de 1% não foi considerada cálcio dependente.

Lima et al. (2004) mostraram que a adição de CaCl_2 no extrato de *Penicillium aurantiogriseum* ocasionou efeito inibitório do extrato. Outros autores também mostraram efeito inativante do cálcio sobre lipases de *Pseudomonas aeruginosa* (Karadzic et al., 2006), *Flavobacterium odoratum* (Labuschagne et al., 1997), reduzindo a atividade em até 44%. Em alguns casos não se observava um grande

efeito do cálcio sobre a enzima, como mostrado por Kanwa et al. (2006), que demonstraram aumento da atividade de somente 10% com adição de até 10mM de Ca^{+2} . Em alguns casos, o efeito inibidor ou ativador pode ser dependente da concentração de cátions. Para lipase purificada de *Aureobasidium pullulans* HN2.3 a adição da concentração de 1mM de CaCl_2 reduziu a atividade relativa para 73% enquanto que adição de 5mM estabilizou atividade em 100% (Liu et al., 2008).

4.3.5.4 Avaliação da especificidade do extrato hidrolítico pré-purificado

Uma enzima pode apresentar diferentes taxas de hidrólise sobre triacilgliceróis, diacilgliceróis ou monoacilgliceróis. Há também a especificidade aos ácidos graxos que compõem o substrato, preferência por ácidos graxos específicos, principalmente quanto ao comprimento da cadeia e número de insaturações (Jensen et al., 1983). Neste contexto, foi realizada uma avaliação quanto à especificidade da lipase pré-purificada de *Penicillium* 58F frente a diferentes triglicerídeos, bem como a ésteres graxos.

a) Especificidade a diferentes triglicerídeos

A determinação da atividade hidrolítica em diferentes triglicerídeos foi avaliada em tributirina, trioleína, tricaprilina e os óleos vegetais de oliva e soja. A Figura 4.26 apresenta a preferência da lipase pré-purificada de *Penicillium* 58F aos triglicerídeos avaliados. As maiores atividades foram obtidas quando a tributirina foi usada como substrato, seguida do óleo de oliva. A preferência ao óleo de oliva era um comportamento que pode ser esperado, já que toda a etapa de seleção das cepas produtoras de lipase foi realizada através da dosagem da atividade neste substrato.

A tributirina é um triglicerídeo de cadeia curta, e portanto facilmente hidrolisável por lipases e esterases (Kim et al., 2007; Chahinian et al., 2005). No caso da *Pseudomonas fluorescens* HU380 a maior atividade foi observada quando a tributirina (C4:0) foi usada na reação (Kojima e Shimizu, 2003), bem como para lipase bruta de *Colletotrichum gloesporioides* (Colen te al., 2006). A lipase concentrada de *Bacillus* sp. A30-1 foi mais específica a triglicerídeos de cadeia média, como a trilaurina (C12:0), seguida de tricaprilina (C10:0) (Wang et al., 1995), da mesma forma a lipase extracelular *Rhizopus oryzae*, para a tricaprilina (C10:0) (Razak et al., 1997). Já a lipase de *Aspergillus*

carneus apresentou boas atividades em uma faixa de triglicerídeos variando de C4 a C18 (Saxena et al., 2003b).

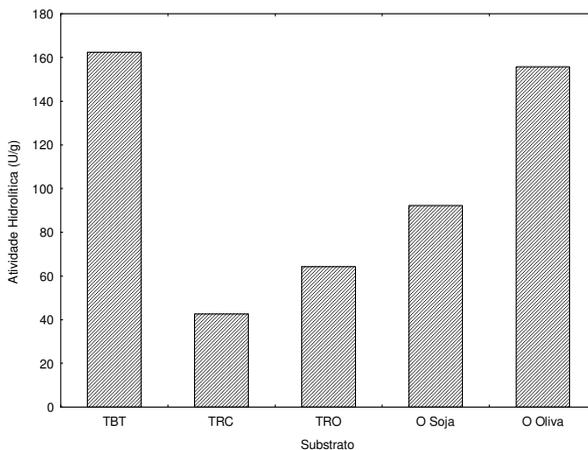


Figura 4.26 - Avaliação da atividade hidrolítica do extrato enzimático pré-purificado seco, em diferentes triglicerídeos

b) Ésteres comerciais do *p*-nitrofenol

A determinação da atividade hidrolítica em diferentes ésteres comerciais foi avaliada para o delineamento da especificidade do extrato hidrolítico frente ao *p*-nitrofenol laurato, estearato, palmitato, butirato. Os dados obtidos durante a realização dos experimentos são apresentados na Figura 4.27. A lipase pré-purificada de *Penicillium* 58F apresentou maior especificidade frente ao éster *p*-nitrofenil laurato (C12:0). Comportamento semelhante foi observado para lipase purificada de *Aspergillus carneus*, sendo esta 5 vezes mais específica para éster *p*-nitrofenil laurato (C12:0) do que ao *p*-nitrofenil palmitato (C16:0) (Saxena et al., 2003b).

As lipases extracelulares produzidas pelo fungo termotolerante *Rhizopus homothallicus* em FES e FS, apresentaram maior especificidade quando éster graxo de cadeia média (C:8) era usado (Diaz et al., 2006), igual preferência foi identificada quando lipase foi produzida por *Bacillus coagulans* MTCC-6375 em FS, resultando em 100% atividade lipásica em *p*-nitrofenol caprilato (*p*NPC), e 86% atividade lipásica em éster de cadeia longa (C16:0) *p*-nitrofenol palmitato (*p*NPP) (Kanwar et al., 2006).

Comportamento contrário foi observado ao avaliar a

especificidade da lipase bruta de *Penicillium aurantiogriseum* frente a diversos substratos. Não foi observado pico de atividade em um substrato específico como no presente caso, do *Penicillium* F58, mas sim uma crescente da atividade, a qual aumentava de acordo com o aumento das cadeias dos ésteres avaliados, *p*-nitrofenil butirato (C4:0) a *p*-nitrofenil palmitato (C16:0) (Lima et al., 2004).

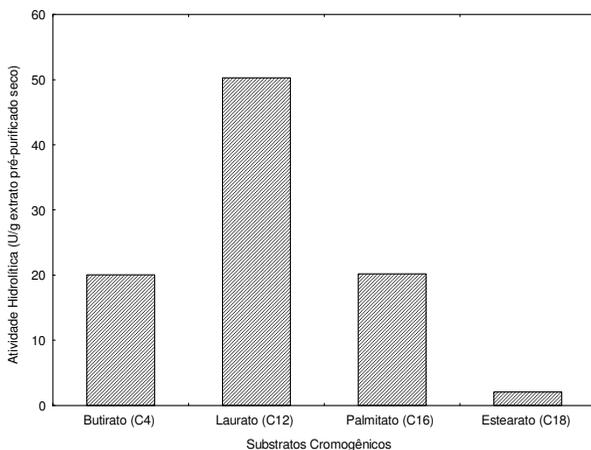


Figura 4.27 - Avaliação da atividade hidrolítica de diferentes ésteres de *p* nitrofenol

CAPITULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

Após a realização deste estudo pode-se concluir que:

- ❖ Dentre os diversos microrganismos isolados, os fungos filamentosos apresentaram os melhores resultados na fermentação em estado sólido (FES) como produtores de lipase com atividade hidrolítica.
- ❖ A fermentação em estado sólido para produção de lipase com atividade hidrolítica usando farelo de soja apresentou bons resultados. O estudo da suplementação realizado com os fungos selecionados 74F e 58F, ambos do gênero *Penicillium*, revelaram o microrganismo 58F como o mais promissor nos distintos pHs avaliados, sendo a suplementação com uréia acrescida de óleo de soja que resultou melhores atividades. A produção da enzima em 48 h de fermentação apresentou pico de produção para pH ácido (140,00 U/g), 96h em meio neutro (196 U/g) e para meio alcalino de 133,56 U/g farelo de soja seco;
- ❖ A técnica de planejamento de experimentos mostrou-se eficiente para maximização do processo fermentativo com o fungo *Penicillium* sp. 58F para produção de lipase hidrolítica. O processo foi maximizado com suplementação (0,60% (p/p) UROS) (C/N 6,11), umidade 75%(p/v), granulometria farelo de soja 2-1 mm, concentração inóculo de 2×10^8 (esporos/g) e temperatura 20(°C);
- ❖ A atividade hidrolítica obtida em meio ácido foi de 200 U/g farelo de soja seco após 120h de fermentação, em neutro de 317 U/g farelo de soja seco em 96h de fermentação e em alcalino obteve-se atividade de 191 U/g farelo de soja seco em 96 h fermentação. Os resultados foram bastante promissores, com altas concentrações de lipase extracelular, possivelmente um *pool* lipases, com potencial hidrolítico em uma ampla faixa de pH;
- ❖ A variação da concentração C/N (2.00, 6.11 e 10.22) mostrou

que altas concentrações de uréia resultaram na diminuição da produtividade, sendo a concentração padrão, C/N 6.11 (farelo de soja) a que resultou nas melhores produtividades considerando a faixa de pH avaliada (4, 7 e 9).

- ❖ A metodologia de planejamento de experimentos mostrou-se útil na otimização da extração da lipase hidrolítica produzida por *Penicillium* sp. em FES. A condição foi otimizada usando tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0 e temperatura de 25°C, 150 rpm, e razão sólido/líquido de 1:4, com incubação de 15 minutos, atingindo-se atividade de 175U/g farelo de soja seco.
- ❖ A caracterização parcial do extrato enzimático hidrolítico bruto e pré-purificado apresentou condições pH e temperatura ótimas de atividade a 37°C e pH 7 e 37°C e faixa de pH de 9 a 10, respectivamente;
- ❖ A maior estabilidade do extrato enzimático hidrolítico bruto e pré-purificado foi obtido à temperatura de 25 °C e pH 7;
- ❖ A estabilidade do extrato enzimático hidrolítico pré-purificado frente a sais de cálcio demonstrou que a lipase não é cálcio dependente, sendo que com o aumento da concentração de cálcio ocorreu queda gradativa da atividade relativa da lipase hidrolítica;
- ❖ A especificidade do extrato enzimático hidrolítico pré-purificado indicou a preferência ao óleo de oliva (substrato usado na etapa de seleção das cepas) e da tributirina, bem como ao éster *p*-nitrofenil laurato (C12:0), apresentando, assim, boas atividades em uma faixa de triglicerídeos variando de C4 a C18;
- ❖ Foi possível selecionar potenciais microrganismos produtores de lipases com atividade de esterificação. As cepas 69F, 161L, mostraram-se hábeis a catalisar a reação de produção de *n*-propil oleato.

5.2. Sugestões para trabalhos futuros

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

- ❖ Purificação de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando sistemas aquosos bifásicos e processos de

- separação com membrana;
- ❖ Aplicações do extrato enzimático hidrolítico obtido através do *Penicillium* sp. em reações de interesse;
- ❖ Avaliação da produção de lipases com atividade de hidrólise e esterificação utilizando diferentes resíduos agro-industriais como substratos buscando produção de lipases com diferentes características bioquímicas;
- ❖ Otimização da produção de lipases com atividade de esterificação em FES utilizando os microrganismo selecionados;
- ❖ Otimização da produção de lipases com atividade de hidrólise e esterificação em sistema submerso;
- ❖ Purificação e imobilização dos extratos enzimáticos brutos obtidos utilizando lipase com atividade de esterificação;
- ❖ Verificação da estabilidade das lipases imobilizadas com atividade de síntese frente a solventes orgânicos;
- ❖ Caracterização parcial (temperatura e pH ótimos e de estabilidade e estabilidade a baixas temperaturas) da enzima imobilizada;
- ❖ Acompanhamento da atividade hidrolítica e de esterificação do extrato enzimático submetido à alta pressão;
- ❖ Produção de biodiesel em fluidos pressurizados utilizando lipases não comercial.

REFERÊNCIAS

Alkan, H., Baisal, Z., Uyar, F., Dogru, M., (2007). Production of Lipase by a Newly Isolated *Bacillus coagulans* Under Solid-State Fermentation Using Melon Wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136, 183-192.

Asther, M., Haon, M., Roussos, S., Record, E., Delattre, M., Meessen-Lesage, L., Labat, M., Asther, M., (2002). Feruloyl esterase from *Aspergillus niger* a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 38, 685-691.

Azeredo, L.A.I., Gomes, P.M., Sant'Anna Jr, G., Castilho, L.R., Freire, D.M.G., (2007). Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. *Current Microbiology*, 54, 361-365.

Barnett, H.L.; Hunter, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi. 4^o ed. New York: Burgess Publishing, 1986

Baron, A.M., Sarquis, M.I.M., Baigori, M., Michell, D.A., Krieger, N., (2005). A comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium coryophilum* in water-restricted environments. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 34, 25-32.

Benjamin, S., Pandey, A., (2000). [Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation](#). *Biology and Technology*, 43, p. 453-460.

Bernardes, O.L., Bevilaqua, J.V., Leal, M.C.M.R., Freire, D.M.G., Lagnone, M.A.P., (2007). Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136-140, 105-114.

Borzani, W., Shmidell, W., Lima, U.A., Aquarone, E., (2001). *Biotechnologia industrial: fundamentos*. São Paulo: Edgar Blucher, 254p.

Bradoo, S., Rathi, P., Saxena, R.K., Gupta, R., (2002). Microwave-assisted rapid characterization of lipase selectivities. *Journal of Biochemistry*, 51, 115-120.

Bradford, M. M., (1976). A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254.

Brasil, Ministério da Saúde, (2005). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos*. 4. ed. Brasília. Ministério da Saúde.

Burkert, J.F.M., Maugeri, F., Rodrigues, M.I., (2004). Optimization of extracellular lipase production by *Getrichum sp.* using factorial design. *Bioresource Technology*, 91, 77-84.

Cardenas, F., Alvarez, E., Castro-Alvarez, M.S., Sanchez-Montero, J.M., Valmaseda, M., Élson, S.W., Sinisterra, J.V., (2001). Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 14, 111-123.

Carvalho, N.B., Souza, R.L., Castro, H.F., Zanin, G.M., Lima, A.S., Soares, C.M.F., (2008). Sequential Production of Amylolytic and Lipolytic Enzymes by Bacterium Strain Isolated from Petroleum Contaminated Soil. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 150, 25-32.

Carvalho, P.O., Calafatti, S.A., Marassi, M., Silva, D.M., Contesini, F.J., Bizaco, R., (2005). Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Química Nova*, 28, 614-621.

Casa, R.M., Sinisterra, J.V., Sanchez-Montero, J.M., (2006). Characterization and catalytic properties of a new crude lipase from *C. rugosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 599-609.

Castilho, L.R., Polato, C.M.S., Buarque, E.A., Sant'Anna Jr., G.L., Freire, D.M.G., (2000). Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state submerged fermentations. *Biochemistry Engineering Journal*, 4, 239-247.

Castilho, L.R., Alves, T.L.M., Medronho, R.A. (1999). Recovery of pectolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, 34, 181-186.

- Cavalcanti, E.A.C., Gutarra, M.L.E., Freire, D.M.G., Castilho, L.R., Sant'Anna, G.L., (2005). Lipase production by solid-state fermentation in Fixed-Bed bioreactors. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 79-84.
- Chahinian, H., Ali, Y.B., Abousalham, A., Petry, S., Mandrich, L., Manco, G., Canaan, S., Sarda, L., (2005). Substrate specificity and kinetic properties of enzymes belonging to the hormone-sensitive lipase family: Comparison with non-lipolytic and lipolytic carboxylesterases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1738, 29-36.
- Charney, J e Tomarelli, R.M., (1947). A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *Journal of Biological Chemistry*, 171, 501-505.
- Chen, H.Z., Xu, J., Li, Z.H., (2005). Temperature control at different bed depths in a novel solid-state fermentation system with two dynamic changes of air. *Biochemistry Engineering Journal*, 23, 117-122.
- Chinn, M.s., Nokes, S.E., Strobel, H.J., (2008). Influence of moisture content and cultivation duration on *Clostridium thermocellum* 27405 end-product formation in solid substrate cultivation on Avicel. *Bioresource Technology*, 99, 2664-2671.
- Chowdary, G.V., Prapulla, S.G., (2002). The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification. *Process Biochemistry*, 38, 392-397.
- Colen, G., Junqueira, R.G., Moraes-Santos, T., (2006). Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, 881-885.
- Contesini, F.J., Carvalho, P.O., (2006). Esterification of (RS)- Ibuprofen by native and commercial lipases in a two-phase system containing ionic liquids. *Tetrahedron: Asymmetry*, 17, 2069-2073.
- Cordova, J., Nemmaoui, M., Ismaili-Alaoui, M., Morin, A., Roussos, S., Raimbault, M., Benjilali, B., (1998). Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *Journal of Molecular*

Catalysis, 5, 75-78.

Couto, S.R. e Sanromán, M.A., (2005). Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *Journal of Food Engineering*, 76, 291-302.

Damaso, M.C.T., Passianoto, M.A., Freitas, S.C., Freire, DMG., Lago, R.C.A., Couri, S., (2008). Utilization of Agroindustrial Residues for Lipase production by Solid-State Fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 676-681.

Derewenda, Z.S., (1994). Structure and Function of Lipases. *Advances in Protein Chemistry*. 45, 1-52.

Di Luccio, M., Capra, F., Ribeiro, N.P., Vargas, G.D.L.P., Freire, D.M.G., Oliveira, D., (2004). Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113-116, 173-180.

Diaz, J.C., Rodriguez, J.A., Roussos, S., Cordova, J., Abousalham, A., Carriere, F., Baratti, J., (2006). Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1042-1050.

Dominguez, A., Costas, M., Longo, M.A., Sanromán, A., (2003). A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, 25, 1225-1229.

Dutra, J.C.V., Terzi, S.C., Bevilaqua, J.V., Damaso, M.C.T., Couri, S., Langone, M.A.P., Senna, L.F., (2008). Lipase Production in solid-state fermentation monitoring biomass growth of *Aspergillus niger* using digital image processing. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 147, 63-75.

Fernandes, M.L.M., Saad, E.B., Meira, J.A., Ramos, L.P., Mitchell, D.A., Krieger, N., (2007). Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. *Journal of Molecular Catalysis*, 44, 8-13.

- Finkers, P., Ongena, M., Destain, J., Weekers, F., Thonart, P., (2006). Production and down-stream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 756-759.
- Fojan, P., Jonson, P.H., Petersen, M.T.N., Petersen, S.B., (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie* 82, 1033-1041.
- Freire, D.M.G., Gomes, P.M., Bom, E.P.S., Sant'Anna Jr, G.L., (1997). Lipase production by a new promising strain *Penicillium restrictum*. *Applied Biochemistry Biotechnological* 63, 409-421.
- Freire D.M.G., (1996) Seleção de microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum*. Ph D Thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.
- Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H., (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 405-416.
- Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J.P., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Dumont, J., Garsoux, G., Geolette, D., Hoyoux, A., Lonhienne, T., Meuwis, M.A., Feller, G. (2000). Cold-adapted enzymes: from fundamental to biotechnology *Tibtech*, 18, 103-107.
- Gervais, P. e Molin, P., (2003). The role in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 85-101.
- Ginalska, G., Bancercz, R., Kowalska, K., (2004). A thermostable lipase produced by a newly isolated *Geotrichum*-like strain, R59. *J. Ind. Microbiology Biotechnology*, 31, 177-182.
- Gombert, A.K., Pinto A.L., Castilho, L.R., Freire, D.M.G., (1999). Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry*, 35, 85-90.
- Godoy, M.G., Gutarra M.L.E., Maciel, F.M., Felix, S.P., Bevilaqua, J.B., Machado, O.L.T., Freire, D.M.G., (2009). Use of a low-cost methodology for biodetoxification of castor bean waste and lipase production, *Enzyme*

and *Microbial Technology*, 44, 317-322.

González-Viniegra, G., Torres-Favela, E., Aguilar, C.N., Gomez-Romero, S.J., Godínez-Díaz, G., Augur, C., (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems, *Biochemical Engineering Journal*, 13, 157-167.

Griebeler, N., Polloni, A.E., Remonato, D., Arbter, F., Vardanega, R., Cechet, J. L., Di Luccio, M., Oliveira, D., Treichel, H., Cansian, R. L., Rigo, E., Ninow, J. L., (2009).

Isolation and Screening of Lipase-Producing Fungi with Hydrolytic Activity, *Food Bioprocess Technology*. DOI 10.1007/s11947-008-0176-5

Gupta, N., Sahai, V., Gupta, R., (2007). Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. *Process Biochemistry*, 42, 518-526.

Gupta, R., Gupta, N., Rathi P., (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology Biotechnology*, 64, 763-781.

Gutarra, M.L.E., Cavalcanti, E.D.C., Castilho, L.R., Freire, D.M.G. (2005). Lipase Production by solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124, 105-116.

Gutarra, M.L.E., Godoy, M.G., Castilho, L.R., Freire, D.M.G., (2007). Inoculum strategies for *Penicillium simplicissimum* lipase production by solid-state fermentation using a residue from the babassu oil industry. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82, 313-318.

Hasan, F., Shah, A.A., Hamee A., (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 235-251.

Holker, U., Hofer, M., Lenz, J., (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology Biotechnology*, 64, 175-186.

Holker, U. e Lenz, J., (2005). Solid-state fermentation- are there any biotechnological advantages. *Current Opinion in Microbiology*, 8, 301-306.

- Ibrahim,C.O., (2008). Development of applications of industrial enzymes from Malaysian indigenous microbial sources. *Bioresource Technology*, 99, 4572-4582.
- Iso, M., Chen,B., Eguchi,M., Kudo,T., Shrestha,S., (2001). Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis. B:Enzymatic*, 16, 53-58.
- Jaeger, K.E & Reetz, M.T., (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Tibtech*, 16, 396-403.
- Jaeger,KE., and Eggert,T., (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*,13,390-397.
- Jensen, R.G., (1983). Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. *Lipids*, 18, 650-657.
- Joseph,B., Ramteke,P.W., Thomas,G., (2008). Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnology Advances*, 26, 457-470.
- Karadzic,I., Masui,A., Zivkovic,L.I., Fujiwara,N., (2006). Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102,82-89.
- Kamini, N.R., Mala, J.G.S., Puvanakrishnan, R., (1998). Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochemistry*, 33, 505-511.
- Kanwar, S.S., Ghazi, I.A., Chimni, S.S., Joshi, G.K., Rao, G.V., Kaushal, R.K., Gupta, R., Punj, V., (2006). Purification and properties of a novel extra-cellular thermotolerant metalloproteinase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375 isolate. *Protein Expression & Purification*, 46, 421-428.
- Kempka, A.P., Lipke, N.L., Pinheiro, T.L.F., Menoncin, S., Treichel, H., Freire, D.M.G., Di Luccio, M., Oliveira, D., (2008). Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 31, 119-125.

- Kim, J.-T., Kang, S. G., Woo, J.-H., Lee, J.-H., Jeong, B.C., Kim, S.-J., (2007). Screening and its potential application of lipolytic activity from a marine environment: characterization of a novel esterase from *Yarrowia lipolytica* CL180. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 820-828.
- Kiran, G.S., Shanmughapriya, S., Jayalakshmi, J., Selvin, J., Gandhimathi, R., Sivaramakrishnan, S., Arunkumar, M., Thangavelu, T., Natarajaseenivasan, K., (2008). Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057). *Bioprocess Biosystem. Eng*, 31, 483-492.
- Klibanov, A.M., (1989). Enzymatic Catalysis in Anhydrous Organic Solvents. *Trends in Biochemical Sciences*, 14, 141-144.
- Ko, W.H., Wang, I.T. & Ann P.J., (2005) A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 597-599.
- Kojima, Y. & Shimizu, S., (2003). Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU 380. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96, 219-226.
- Kouker, G. & Jaeger, K.E., (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipase. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 211-213.
- Kraai, G.N., Winkelman, J.G.M., de Vries, J.G., Heeres, H.J., (2008). Kinetic studies on the *Rhizomucor miehei* lipase catalyzed esterification reaction of oleic acid with 1-butanol in a biphasic system. *Biochemical Engineering Journal*, 41, 87-94.
- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S.S, Gupta, R., (2005). Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression Purificati*, 41, 38-44.
- Labuschagne, R.B., Van Tonder, A., Litthauer, D., (1997). *Flavobacterium odoratum* lipase: isolation and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 52-58.

- Langone, M.A.P., & Sant'Anna Jr., G.L., (1999). Enzymatic Synthesis of Medium-Chain Triglycerides in a Solvent-Free System. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77-79, 759.
- Lima, V.M.G., Krieger, N., Mitchell, D.A., Fontana, J.D., (2004). Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochemical Engineering Journal*, 18, 65-71.
- Lin, E.S., Ko, H.C., (2005). Glucose stimulates production of the alkaline-thermostable lipase of the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea*, 37, 261-265.
- Liu, Z., Chi, Z., Wang, L., Li, J., (2008). Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullolans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. *Biochemical Engineering Journal*, 40, 445-451.
- Luo, Y., Zhengbing, J., Ma, Y., Wei, D., (2006). A novel psychrophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* with unique property in chiral resolution and biodiesel production via transesterification. *Applied Microbiology Biotechnology*, 73, 349-355.
- Mahadik, N.D., Puntambekar, U.S., Bastawde, K.B., Khire, J.M., Gokhale, D.V., (2002). Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 38, 715-721.
- Mahanta, N., Gupta, A., Khare, S.K., (2008). Production of protease by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresource Technology*, 99, 1729-1735.
- Makhzoum, A., Owusu-Apenten, R.K., Knapp, J.S., (1995). Purification and properties of lipase from *Pseudomonas fluorescens* strain 2D. *Int. Dairy Journal*, 6, 459-472.
- Mala, J.G.S., Edwinoliver, N.G., Kamini, N.R., Puvanakrishnan, R., (2007). Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. *Journal Genetically Applied Microbiology*, 53, 247-253.

Maldonado, R.R., (2006). Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, FEA, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Maria, P.D., e Gago, J.V.S., (1999). Causes of unreproducibility of *C. rugosa* lipase-catalyzed reactions in slightly hydrated organic media. *Tetrahedron*, 55, 8555–8566.

Maria, P.D., Alzamora, F.M., Moreno, S.P., Valero, F., Rua, M.L., Montero, J.M.S., Sinisterra, J.V., Alcantara, A.R., (2002). Heptyl oleate synthesis as useful tool to discriminate between lipases, proteases and other hydrolases in crude preparations. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 283-288.

Martins, V.G., Kalil, S.J., Costa, J.V., (2008). Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. *Química nova*, 31, 1942-1947.

Mazutti, M., Bender, J.P., Treichel, H. Di Luccio, M. (2006). Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 56-59.

Menoncin, S., Domínguez, N.M., Freire, D.M.G., Toniazzo, G., Cansian, R.L., Oliveira, J.V., Di Luccio, M., Oliveira, D., Treichel, H., (2008). Study of the extraction, concentration, and partial characterization of lipases obtained from *Penicillium verrucosum* using solid-state fermentation of soybean bran, *Food and Bioprocess Technology: An International Journal*, DOI 10.1007/s11947-008-0104-8.

Mitchell, D.A., Mein, O.F., Krieger, N., (2003). Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 137-147.

Mitchell, D.A., Losane, B. K. (1992). Definition, characteristic and potential. In: Doelle, H., Mitchell, D.A., Rols C.E. Solid substrate cultivation. *Elsevier Applied Science*, 1-16.

Mitchell, D.A., Berovic, M., Krieger, N. (2002). Overview of solid state

bioprocessing. *Biotechnology Annual Review*, 8, 183-225.

Nagel F.J., Oostra, J., Tramper, J., Rinzema, A., (1999). Improved model system for solid-substrate fermentation: effects of pH, nutrients and buffer on fungal growth rate. *Process Biochemistry*, 35, 69-75.

Nagy, V., Toke, E.R., Keong, L.C., Szatzker, G., Ibrahim, D., Omar, I.C., Szakacs, G., Poppe, L., (2006). Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 39, 141-148.

Nawani, N. e Kaur, J., (2007). Studies on a lipolytic isoenzymes from a thermophilic *Bacillus* sp.: Production, purification and biochemical characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 881-887.

Palma M.B., Pinto A.L., Gombert A.K., Seitz K.H., Kivatinitz S.C., Castilho L.R., Freire, D.M.G., (2000). Lipase Production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Applied Biochem. And Biotechnology*, 84-86, 1137-1145.

Pandey, A., (2003), Solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 81-84.

Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D., (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35, 1153-1169.

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Kriger, N., Soccol, V.T., (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology Applied Biochemist*, 29, 119-131.

Pertersen, M. e Daniel, R., (2006). Purification and characterization of an extracellular lipase from *Clostridium tetanomorphum*. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, 431-435.

Persson, M., Mladenoska, I., Wehtje, E., Patrick Adlercreutz, P., (2002). Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 833-841

- Prazeres, J.N., Cruz, J.A.B., Pastore, G.M., (2006). Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 505-5-9.
- Raghavarao, K.S.M.S., Ranganathan, T.V., Karanth, N.G., (2003). Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 127-135.
- Rahardjo, Y.S.P., Jolink, F., Haemers, S., Tramper, J., Rinzema, A., (2005). Significance of bed porosity, bran and specific surface area in solid-state cultivation of *Aspergillus oryzae*. *Biomolecular Engineering*, 22, 133-139.
- Rajendran, A., Palanisamy, A., Thangavelu, V., (2008). Evaluation of medium components by Plackett-Burman Statistical Design for lipase production by *Candida rugosa* and kinetics modeling. *Chinese Journal of Biotechnology*, 24, 436-444.
- Ramachandran, S., Singh, S.K., Larroche, C., Soccol, C.R., Pandey, A., (2007). Oil cakes and their biotechnological applications-A review. *Bioresource Technology*, 98, 2000-2009.
- Razak, C.N.A., Salleh, A.B., Musani, R., Samad, M.Y., Basri, M., (1997). Some characteristics of lipases from thermophilic fungi isolated from palm oil effluent. *Journal of Molecular Catalysis*, 3, 153-159.
- Ribeiro, M.C. & Soares, M.M., (1993). *Microbiologia Prática - Roteiro e Manual, bactérias e fungos*. Atheneu, São Paulo.
- Rodrigues, M.I. e Iemma, A.F., (2005). *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos*. Casa do Pão. Campinas.
- Rodriguez JA, Mateos JC, Nungaray J, González V, Bhagnagar T, Roussos S, Cordova J., Baratti. J., (2006) Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 41, 2264-2269.
- Romero, C.M., Baigori, M.D., Pera, L.M., (2007). Catalytic properties of mycelium-bound lipases from *Aspergillus niger* MYA 135. *Applied*

Microbiology Biotechnology, 76, 861-866.

Rossetto, C. A. V.; Viegas, E. C.; Lima, T. M. (2003). Contaminação fúngica do amendoim em função das doses de calcário e épocas de amostragem. *Bragantia, London*, 62, 437-445.

Ruiz, C., Falcocchio, S., Xoxi, E., Pastor, F.I.J., Diaz, P., Saso, L., (2004). Activation and inhibition of *Cândida rugosa* and *Bacillus*- related lipases by saturated fatty acids, evaluated by a new colorimetric microassay. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1672, 184-191.

Ruiz,A.M., Garcia,H.S., Castañeda,G.S., Torres,E.F., (2008). Organic phase synthesis of ethyl oleate using lipases produced by solid-state fermentation. *Applied Biochemistry Biotechnology*, DOI 10.1007/s12010-008-8207-2.

Saisubramainian, N., Edwinoliver, N.G., Nandakumar, N., Kamini, N.R., Puvanakrishnan., (2006). Efficacy of lipase from *Aspergillus niger* as an additive in detergent formulations: a statistical approach. *Journal Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 669-676.

Salah, R.B., Ghamghui,H., Miled, N., Mejdoub,H., Gargouri, Y., (2007). Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 4, 368-372.

Sandoval, G. e Marty, A., (2007). Screening methods for synthetic activity of lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 390-393.

Santos, M.M., Rosa, A.S., Dal'Boit, S., Mitchell, D.M., Krieger, N., (2004). Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes. *Bioresource Technology*, 93, 261-268.

Saxena, R.K., Sheoran, A., Bhoopander, G., Davidson, S., (2003a). Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiology Methods*, 52, 1-18.

Saxena, R.K., Davidson, W.S., Sheoran, A., Giri, B., (2003b). Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochemistry*, 39, 239-247.

- Sharma, R., Chisti, Y. & Banerjee, U.C., (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627-662.
- Sharma, R., Soni, S.K., Vohra, R.M., Gupta, L.K., Gupta, J.K., (2002). Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus sp.* RSJ-1. *Process Biochemistry*, 37, 1075-1084.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., (2002). Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of molecular Catalysis B: enzymatic*, 17, 133-142.
- Shu, C.H., Xu, C.J., Lin, G.C., (2006). Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*, 41, 734-738.
- Silva, W.O.B., Mitidieri, S., Schrank, A., Vainstein, M.H., (2005). Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* *Process Biochemistry*, 40, 321-326.
- Socol, C.R. & Vandenberghe, L.P.S., (2003) Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 205-218.
- Sun, S.Y. & Xu, Y., (2008). Solid-state fermentation for whole-cell synthetic lipase production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. *Process Biochemistry*, 43, 219-224.
- Suryanarayan, S., (2003). Current industrial practice in solid state fermentations for secondary metabolite production: the Biocon India experience. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 189-195.
- Takaç, S. e Marul, B., (2008). Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*, *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*, 35, 1019-1025.
- Tan, T., Zhang, M., Wang, B., Ying, C., Deng, Li., (2003). Screening of high lipase producing *Candida sp.* And production of lipase by

- fermentation. *Process Biochemistry*, 39, 459-465.
- Torres,S., and Castro,G., (2004). Non-aqueous biocatalysis in homogenous systems. *Food Technology Biotecnology*, 42,271-277.
- Treichel, H., Oliveira, D., Mazutti, M.A., Di Luccio, M., Oliveira, V.J., (2009). A review on Microbial Lipases production. *Food Bioprocess Technology*, DOI 10.1007/s11947-009-0202-2.
- Ul-Haq, I., Idrees, S., Rajoka, M.I., (2002). Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 37, 637-641.
- Vargas, G.D.L.P., Treichel, H., Oliveira, D., Beneti, S.C., Freire, D.M.G., Di Luccio, M., (2008). Optimization of lipase production by *Penicillium simplicicium* in soybean meal. *Journal Chemistry Technology Biotechnology*,, 83, 47-54.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille, J., Haas, M.M., (2000). Customizing Lipases for Biocatalysis: a Survey of Chemical, Physical and Molecular Biological Approches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9, 113-148.
- Villeneuve,P., (2007). Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnology Advances*, 25, 515-536.
- Wang, S.L., Lin, Y.T., Liang, T.W., Chio, S.H., Ming, L.J., Wu, P.C., (2009). Purification and characterization of extracellular lipases from *Pseudomonas monteilii* TKU009 by the use of soybeans as substrate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 36, 65-73.
- Wang, W.K., (2001). *Membrane Separations in Biotechnology*. Second Edition, *Marcel Dekker, Inc.* New York.
- Wang, Y., Srivastava, K.C., Shen, G.J., Wang, H.Y., (1995). Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC 53841). *Journal Fermentation and Bioengineering*, 79, 433-438.
- Wolski E, Menusi E, Mazutti M, Toniazzo, G., Rigo, E., Cansian, R.L.,

Mossi, A., Oliveira, J.V., Di Luccio, M., Oliveira, D., Treichel, H., (2008). Response Surface Methodology for Optimization of Lipase Production by an Immobilized Newly Isolated *Penicillium* sp. *Industrial & Engineering Chemistry Research* , 47, 9651-9657.

Wolski, E., Rigo, E., Di Luccio, M., Oliveira, J.V., Oliveira, D., Treichel, H., (2009a). Production and partial characterization of lipases from a newly isolated *Penicillium* sp. using experimental design. *Letters in Applied Microbiology*, 49, 60-66.

Wolski, E., Menusi, E., Remonato, D., Vardanega, R., Arbter, F., Rigo, E., Mazutti, Márcio, A., Di Luccio, M., Ninow, J., de Oliveira, D., Treichel, H., (2009b) Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid state and submerged fermentation: a comparative study, *LWT - Food Science and Technology* doi: 10.1016/j.lwt.2009.04.006

Zarevúcka, M., Kejík, Z., Saman, D., Wimmer, Z., Demnerová, K., (2005). Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 481-486.

Zeman, L.J., and Zydney, A.L., 1996. Microfiltration and Ultrafiltration. Principles and Applications. *Marcel Dekker, INC.* New York.

ANEXOS

Anexo I - Solução de azocaseína 0,5%

Pesar 1 g de azocaseína, adicionar 20 mL de água destilada, acrescentar solução de hidróxido de sódio 40% até chegar a pH 12,0. Adicionar ácido acético até chegar ao pH 5,0, completar o volume para 200 mL com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0.

Anexo II - pH ótimo do extrato pré-purificado**Tabela 7.1** Efeito dos valores de pH na atividade hidrolítica do extrato enzimático pré-purificado

<i>Valor pH Solução Tampão</i>	<i>Atividade Relativa (%)</i>
3	8,44 ± 0,85 ^b
4	12,95 ± 1,67 ^b
5	34,95 ± 0,21 ^c
6	46,86 ± 0,96 ^d
7	89,13 ± 2,39 ^e
8	64,23 ± 0,94 ^f
9	98,00 ± 1,28 ^a
10	100,00 ± 0,66 ^a

Médias ± desvio padrão seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Anexo III - pH ótimo do extrato pré-purificado**Tabela 7.2** - Efeito da temperatura de incubação na atividade hidrolítica do extrato enzimático pré-purificado

<i>Temperatura(°C)</i>	<i>Atividade Relativa (%)</i>
20	79,61 ± 1,63 ^c
25	85,62 ± 2,00 ^b
30	86,00 ± 0,70 ^b
35	83,00 ± 1,29 ^c
37	100,00 ± 1,31 ^a
40	91,00 ± 1,59 ^b
45	89,47 ± 0,85 ^b

Médias ± desvio padrão seguidas de letras diferentes, diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.