

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS – PEP

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS UTILIZANDO
BACTÉRIA ISOLADA DE SOLO COM HISTÓRICO DE
CONTATO COM PETRÓLEO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

Autor: Ingrid Cavalcanti Feitosa

Orientadores: Prof^o Álvaro Silva Lima, D.Sc

Prof^a Cleide Mara Farias Soares, D.Sc.

Prof^o. Manoel Marcelo do Prado, D.Sc.

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2009

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS UTILIZANDO BACTÉRIA
ISOLADA DE SOLO COM HISTÓRICO DE CONTATO COM
PETRÓLEO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

Ingrid Cavalcanti Feitosa

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

Aprovada por:

Álvaro Silva Lima

Cleide Mara Faria Soares

Manoel Marcelo do Prado

Gisella Maria Zanin

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2009

XXXX Feitosa, Ingrid Cavalcanti.

Produção de Enzimas Lipolíticas utilizando Bactéria Isolada de Solo com Histórico de Contato com Petróleo em Fermentação Submersa /Ingrid Cavalcanti Feitosa; orientação [de] Álvaro Silva Lima, Cleide Mara Faria Soares, Manoel Marcelo do Prado. – Aracaju, 2009.

89 p. : il. ; 30 cm

Inclui bibliografia

Dissertação (Mestrado em engenharia de Processo) – Universidade Tiradentes, 2009.

1. Fermentação Submersa. 2. Atividade Lipolítica, 3 Indutor 4 Aditivos. I Lima, Álvaro Silva. II. Soares, Cleide Mara Faria. III. Prado, Manoel Marcelo. IV. Título.

XXXXXX

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos.

PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS UTILIZANDO BACTÉRIA ISOLADA
DE SOLO COM HISTÓRICO DE CONTATO COM PETRÓLEO EM
FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Ingrid Cavalcanti Feitosa

Sabe-se que um dos inconvenientes sob o ponto de vista econômico no uso de enzimas é a disponibilidade comercial, a atividade (relação produto formado/enzima) e sobre tudo a estabilidade do biocatalisador, embora sejam altamente específicas e apresentarem alta eficiência catalítica, normalmente não são empregadas em larga escala por serem altamente sensíveis às variações do meio reacional. O processo considerado mais utilizado para a produção de enzimas é a fermentação submersa, devido à facilidade dos microrganismos de crescerem em condições controladas de pH e temperatura. Com o intuito de estimular a produção de enzimas, a literatura aponta que a adição de aditivos como Triton X, PEG e Tween inseridos no meio de cultura desempenham um papel fundamental, atuando de forma específica na enzima. Para a obtenção de uma enzima com o máximo de atividade (unidade enzimática por mg de proteína), métodos de purificação como a técnica de precipitação utilizando o sulfato de amônio como reagente são escolhidas devido ao seu baixo custo, alta solubilidade e proteção natural das enzimas. Para garantir a preservação, a estabilidade e a manutenção das propriedades originais das enzimas a longo prazo, técnicas de secagem de enzimas são empregadas, pois garantem que a atividade enzimática específica se mantenha intacta. O presente estudo definiu as melhores condições na fermentação submersa para a produção de enzimas lipolíticas, aplicando ferramentas como o planejamento de experimentos.

Palavras Chaves - fermentação submersa; atividade lipolítica; indutor

Abstract of Dissertation presented to the Process Engineering Graduate Program of Universidade Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

PRODUCTION OF ENZYMES LIPOLYTICS USING BACTERIUM ISOLATES
FROM SOIL WITH HISTORY OF CONTACT WITH OIL IN SUBMERGED
FERMENTATION

Ingrid Cavalcanti Feitosa

It is known that one of the drawbacks from the economic point of view the use of enzymes is the commercial availability, the activity (relative product formed / enzyme) and mainly the stability of the biocatalysts, but are highly specific and shows high catalytic efficiency, usually are not employed on a large scale because they are highly sensitive to variations in the reaction medium. The process considered more used for the production of enzymes is the submerged fermentation due to the ease of microorganisms to grow under controlled conditions of pH and temperature. In order to stimulate the production of enzymes, the literature indicates that the addition of additives such as Triton X, Tween and PEG added in the culture medium play a key role, working in a specific way in the enzyme. To obtain an enzyme with maximum activity (enzyme unit per mg of protein), methods of purification as the technique of precipitation using ammonium sulfate as reagent are chosen because of its low cost, high solubility and protection of natural enzymes. To ensure the preservation, stability and maintaining the original properties of enzymes in the long term, techniques for drying of enzymes are used, because they ensure that the specific enzyme activity remains intact. This study defined the best conditions in submerged fermentation for the production of lipolytic enzymes, using tools such as experimental design..

Key-Words: submerged fermentation; lipolytic activity; inductor.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
3.1. ENZIMAS.....	13
3.1.1. Enzimas Lipolíticas.....	14
3.1.2. Vantagens das Enzimas Lipolíticas.....	16
3.1.3. Enzimas Lipolíticas de Origem Microbiana.....	17
3.1.4. Classificação de Enzimas Lipolíticas.....	19
3.1.5. Aplicações das Enzimas Lipolíticas.....	20
3.2. PROCESSOS FERMENTATIVOS.....	26
3.2.1. Fermentação Submersa.....	26
3.2.2. Fermentação em Estado Semi-Sólido.....	28
3.3. INFLUÊNCIA DO MEIO NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS.....	28
3.4. INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE SURFACTANTES NA FERMENTAÇÃO PARA PRODUZIR ENZIMAS LIPOLÍTICAS.....	32
3.4.1. Triton X.....	32
3.4.2. Tween.....	33
3.4.3. PEG (Polietileno-glicol).....	34
3.5. PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA.....	35
3.6. SECAGEM DE ENZIMAS.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1.1. Microrganismo.....	40
4.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	41
4.2.2. Fermentação submersa.....	43
4.2.3. Influência da concentração do indutor óleo de coco.....	43
4.2.4. Influência do pH e da temperatura.....	43

4.2.4. Influência da adição de aditivos	44
4.2.5. Pré-purificação enzimática	45
4.2.6. Secagem Enzimática.....	45
4.3.1. Concentração de Proteínas	46
4.3.2. Concentração de Amido	47
4.3.3. Atividade lipolítica	47
4.3.4. Concentração de massa celular seca (X)	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. Influência da Concentração do Óleo de Coco como Indutor.....	49
5.2. Influência do pH e da temperatura	54
5.2.1. Estudo cinético da fermentação submersa.....	54
5.3. Influência da Adição de Surfactantes no meio de cultura	62
5.3.1. Resultados do planejamento de experimentos para estudo da influencia de surfactantes na fermentação para produção de lipase.....	64
5.5. Pré-Purificação	71
5.6. Secagem de Enzimas	74
6.0. CONCLUSÃO.....	79
7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo, catalisada por lipases (MENDES et al., 2005).	15
Figura 2: Reações catalisadas por lípases do tipo não-específica e 1,3 específica (PAQUES et al., 2006).	20
Figura 3: Fluxograma do processo de obtenção de enzimas lipolíticas.	42
Figura 5.1. Perfil da atividade lipolítica, da biomassa e do amido, utilizando o óleo de coco como indutor a 1% (a), 2% (b), 3% (c) e (4%).	51
Figura 5.2. Resultados da fermentação para produção de enzima lipolítica a temperatura de 24°C e pH 3,0 (a) e 7,0 (b).	55
Figura 5.3. Resultados da fermentação para produção de enzima lipolítica a temperatura de 37°C e pH 3,0 (a) e 7,0 (b).	57
Figura 5.4. Resultados da fermentação para produção de enzima lipolítica a temperatura de 30oC e pH 5,0	58
Figura 5.5. Perfil do pH com relação ao tempo.	58
Figura 5.6. Superfície de Resposta para o estudo de avaliação da temperatura e pH ótimos para a produção de enzimas lipolíticas	60
Figura 5.7. Resultados da fermentação para obtenção de lípase em presença de 1% de Triton X (a), Tween 80 (b) e PEG (c).	63
Figura 5.8. Resultados da fermentação para produção de lípase utilizando 0,2% de Triton X-100. (a) e 0,2% de Tween 80. (b)	65
Figura 5.9. Resultados da fermentação para produção de lípase utilizando 0,2% de de Triton X-100. (a) e 0,2% de Tween 80. (b).	66
Figura 5.10. Resultados da fermentação para produção de lípase utilizando 0,6% de de Triton X-100. (a) e de Tween 80. (b)	68
Figura 5.11. Superfície de Resposta para o estudo de	71
avaliação da concentração dos aditivos Tween e Triton X-100.	71
Figura 5.12. Perfil	Erro! Indicador não definido.
Figura 5.13: Perfil do efeito da temperatura em relação à derivada da base seca. ...	Erro!
Indicador não definido.	
Figura 5.14. Perfil da Atividade Específica com relação ao tempo	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lipase produzidas por diferentes microrganismos.	18
Tabela 2. Fontes biológicas e seus respectivos fornecedores.	21
Tabela 2.1: Exemplos de aplicações industriais de enzimas lipolíticas.	22
Tabela 4. Meio de Cultura	43
Tabela 4.1: Matriz do planejamento fatorial 22 empregado no estudo da influência da temperatura e do pH.	44
Tabela 4.2: Matriz do planejamento fatorial 22 empregado no estudo da influência da temperatura e do pH.	45
Tabela 5.1. Apresentação Geral dos Ensaios Realizados	48
Tabela 5.2: Concentrações e seus respectivos valores máximos.....	53
Tabela 5.3. Perfil do pH com as concentrações de 1%, 2%, 3% e 4% de óleo de coco como indutor, com temperatura de 30°C e pH 5,0.	53
Tabela 5.4. Resultado do planejamento de experimentos para averiguação do efeito do pH e temperatura na produção de enzimas lipolíticas	54
Tabela 5.5. Estimativas de Efeito calculadas no estudo de avaliação	59
da temperatura e pH ótimos para a produção de enzimas lipolíticas.....	59
Tabela 5.6. Análise de variância para o estudo de avaliação da temperatura.....	59
e pH para a produção de enzimas lipolíticas.	59
Tabela 5.7. Melhores resultados da fermentação com e sem adição de aditivos para produção de lípase a 37oC e pH 7,0.	64
Tabela 5.8. Planejamento de experimentos com diferentes concentrações de aditivos. 68	
Tabela 5.9. Estimativas de Efeito calculadas no estudo de avaliação da	69
concentração dos aditivos Tween e Triton X-100.	69
Tabela 5.10. Análise de variância para o estudo de avaliação da concentração dos aditivos Tween e Triton X-100.....	70
Tabela 5.11. Pré – Purificação enzimática do substrato fermentado utilizando Tween 80.	80

1.INTRODUÇÃO

As enzimas lipolíticas provenientes de microrganismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, devido principalmente à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato, e facilidade de produção em massa, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial tais como na indústria de alimentos, têxtil, efluentes, detergentes, etc (HASAN et al., 2006). De acordo com GHANDI (1997), mais de 95% dos processos enzimáticos empregados atualmente utilizam hidrolases (proteases, carboidrolases e lipases), sendo que 5 – 10% são devido ao uso de enzimas lipolíticas.

Uma maior aplicação industrial destes biocatalisadores, face às vantagens por estes apresentadas, é o melhoramento dos processos de produção e de purificação, os quais ainda apresentam um custo elevado. A melhora na produção pode ser feita a partir da descoberta de novos microrganismos produtores; do melhoramento genético daqueles já utilizados; de modificações na composição e otimização dos meios de cultivo, utilizando substratos de baixo custo e de modificações no modo de condução da fermentação, como o pH, temperatura e aeração que podem afetar a produção de enzimas lipolíticas extracelular (CASTILHO *et al*, 2000; CORZO e REVAH, 1999).

Particularmente, as enzimas lipolíticas de origem microbiana são mais estáveis que as extraídas de plantas e animais, tornando sua produção mais conveniente e isenta de riscos. Esta estabilidade ocorre devido a algumas características peculiares destas enzimas, como sua regioespecificidade e sua enantioseletividade, estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH (MAIA *et al* 1999; PASTORE *et al*, 2003).

Com a finalidade de induzir a produção de enzimas lipolíticas alguns compostos como os ácidos graxos, triglicerídeos e surfactantes. têm sido muitas vezes utilizados. Destacando-se entre os compostos os aditivos Triton X, Tween e PEG que atuam de forma específica na produção de enzimas lipolíticas, levando a uma estabilidade térmica durante o processo, a redução do tempo durante a produção e a geração de uma maior quantidade de enzimas, resultando assim numa maior atividade específica.

No entanto para a aquisição de enzimas que possam obter uma atividade máxima é necessário que haja enzimas específicas que possam potencializar essa atividade, para isso, processos de purificação enzimáticos são utilizados, entre os quais destaca-se o método de separação por precipitação de enzimas por salificação “salting out”,

considerado um método acessível e de baixo custo devido à utilização de sais como reagente, os quais apresentam algumas vantagens como: a não interferência na sedimentação da maioria das proteínas durante a centrifugação e a não promoção do aquecimento da solução.

Na busca por processos que conseguissem prolongar o tempo de meia vida de enzimas, surgiram os processos de secagem de enzimas que tem como objetivo principal garantir a preservação, a estabilidade e a manutenção das propriedades originais das enzimas permitindo que a atividade enzimática específica se mantenha intacta.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Otimizar o processo de produção, pré-purificar e fazer a secagem das enzimas lipolíticas a partir de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo, em fermentação submersa.

Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da concentração de óleo de coco, como indutor na produção de enzimas lipolíticas; selecionar por meio da metodologia de planejamento experimental a melhor condição de pH e temperatura para a fermentação; analisar o efeito da adição de surfactantes (Triton X-100, Tween 80 e PEG 1500) para a produção de enzimas lipolíticas; estudar a pré-purificação das enzimas por meio de precipitação com sulfato de amônio; e por fim secar o extrato enzimático pré-purificado utilizando radiação infravermelho.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. ENZIMAS

As enzimas são biocatalisadores de estrutura protéica globular terciária ou quaternária, termolábeis e não dialisáveis, que aceleram a velocidade de uma reação química, isto é, atuam reduzindo a barreira energética destas reações. As enzimas efetuam processos metabólicos na célula viva. Ocorrem em todos os organismos vivos sejam plantas ou animais, desde os mais simples, como formas unicelulares de vida, aos mais desenvolvidos (HARGER, 1982).

Como o mecanismo celular dos sistemas vivos, animais, vegetais e microrganismos depende das enzimas, a fonte primária destas são tecidos animais (principalmente glândulas), tecidos vegetais (sementes e frutas) e culturas de microrganismos, quer se fazendo uso de cultivo total, quer extraindo enzimas do meio de cultura de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (KIELING, 2002).

As enzimas apresentam a capacidade de reagir com determinados constituintes das células, os substratos, formando complexos: enzima-substrato, e subsequente formação do produto, fato este denominado de atividade enzimática. Esta atividade vai depender da estrutura da proteína, isto é, do número de cadeias peptídicas e arranjo dessas cadeias na molécula, da natureza do substrato e ainda, se existir, da natureza do grupo prostético. A determinação da atividade enzimática pode ser obtida a partir da enzima livre ou imobilizada sob condições tais que permitam que a velocidade de reação seja máxima, o que significa que o substrato [S] deve estar em concentração elevada, de modo a permitir que toda a enzima [E] esteja transformada em um complexo ativado [ES]. Neste caso a velocidade [V] da reação, proporcional à concentração enzimática, será também proporcional ao complexo [ES] (KIELING, 2002).

De acordo com SCRIBAN (1998), a atividade das enzimas é função direta da sua estrutura terciária e quaternária. A conformação das propriedades da enzima, como: aquecimento, modificação de pH e pressão, modificadas por tratamentos que resultem num impedimento ou dificuldade de fixação do substrato na enzima ou causando propriedades catalíticas, conseqüentemente em seu funcionamento. Consta numa máxima, esta variação da atividade em função da temperatura é determinada em condições ótimas de operação e resulta de dois efeitos antagônicos: a colisão entre o

substrato e a enzima causada pela agitação das moléculas devido ao aumento da temperatura e a desnaturação da proteína, que vai ocasionar uma mudança da estrutura terciária e quaternária da proteína globular, fazendo com que a enzima passe de uma conformação ativa a uma conformação desprovida de atividade. No entanto a desnaturação das enzimas pelo calor só ocorrerá dependendo da duração e da intensidade do tratamento térmico.

Segundo FELLOWS (1994) a atividade enzimática ótima das enzimas microbianas ocorre nas mesmas condições em que se produz o crescimento máximo dos microrganismos. As enzimas microbianas podem ser extracelulares (enzimas eliminadas ao meio) ou intracelulares (enzimas retidas no interior das células microbianas). A produção de enzimas extracelulares é obtida na fase logarítmica de crescimento ou na fase estacionária, enquanto as enzimas intracelulares são produzidas durante o crescimento na fase estacionária e somente são liberadas ao meio pela lise celular que ocorre na fase estacionária ou na fase de declínio. Grande parte das enzimas utilizadas nas indústrias são enzimas extracelulares de origem microbiana.

3.1.1. Enzimas Lipolíticas

As enzimas lipolíticas são encontradas em fontes animais, vegetais e microbianas. Sendo preferencialmente produzidas através das fontes microbianas devido ao aumento da capacidade produtiva durante os processos fermentativos, facilidade de aquisição e controle, além dos baixos custos de obtenção. Segundo SOARES (2000), os microrganismos mais utilizados para a produção de enzimas lipolíticas são fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Mucor*, e leveduras do gênero *Candida*.

As enzimas lipolíticas são biocatalisadores responsáveis por catalisar reações de hidrólise de ésteres de triglicerídeos que ocorre por clivagem seqüencial dos grupos acila no glicerídeo, contendo na mistura reacional água, glicerol, ácidos graxos livres, monoacilgliceróis e diacilgliceróis, (Figura 1). Um elevado número de compostos de alta e baixa massa molecular também pode ser substrato dessa enzima, tais como tioésteres, amidas, poliidroxiésteres/hidroxiácidos, etc. Além da hidrólise, elas também são capazes de catalisar reações reversas, como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóólises e acidólises), aminólise (síntese de amidas) e lactonização, sendo que a atividade de água do meio reacional é um dos fatores determinantes para cada classe de reação (MENDES *et al.*, 2005 e PAQUES *et al.*, 2006).

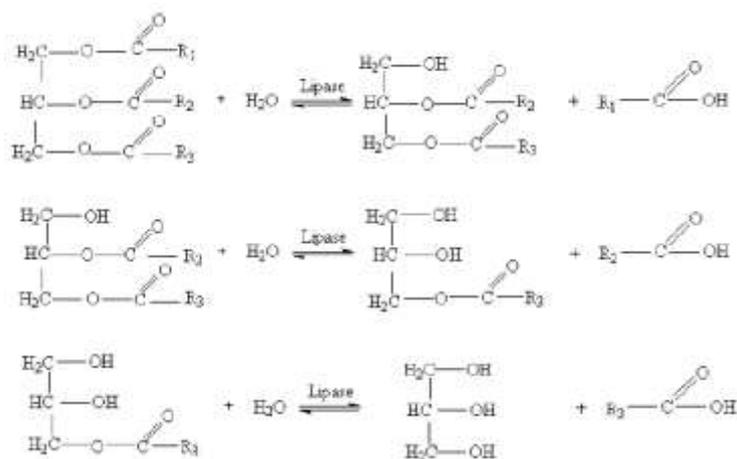


Figura 1: Hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo, catalisada por lipases (MENDES et al., 2005).

A especificidade é uma característica importante das lípases. De forma geral, quatro tipos de especificidades podem ser definidas. A primeira é a especificidade em relação à classe de lipídios. A enzima pode ser específica em relação ao tipo de éster, como por exemplo di-, tri-, ou monoglicerídeo, colesterol éster, metil éster, etc. A segunda é a regioespecificidade, que promove a seletividade da enzima pela posição da ligação éster numa molécula. O terceiro tipo é a especificidade com relação ao resíduo de ácido graxo, na qual a enzima lipolítica é específica em relação ao comprimento da cadeia ou em relação à presença de dupla ligação nesta cadeia. Finalmente, merece referência a estereoespecificidade, ou seja, algumas destas enzimas catalisam apenas a hidrólise ou a esterificação de um ou dois estéreoisômeros (COSTA *et al.* 1999; SOARES, 2000).

Devido à sua alta especificidade, estas enzimas são importantes na área de biotecnologia, principalmente nos setores oleoquímico e em síntese orgânica, na preparação de compostos enantiosseletivos. Estas enzimas são uma categoria que apresentam muitas vantagens em processos de biotransformações, em função de sua grande afinidade por um largo espectro de substratos, versatilidade quanto às características do meio reacional (aquoso, orgânico ou supercrítico), atividade elevada em meio reacional livre de solventes e disponibilidade comercial (PANDEY *et al.*, 1999). Segundo HASAN *et al.* (2006), as enzimas lipolíticas estão atualmente atraindo uma grande atenção devido às suas potencialidades biotecnológicas. Pois constituem o mais importante grupo de biocatalisadores para aplicações neste campo.

Nos últimos anos, grande atenção tem sido voltada para os mecanismos que controlam a acessibilidade do substrato ao sítio ativo das enzimas. O grande número de estruturas tridimensionais das enzimas lipolíticas e de complexos enzima-inibidor foi responsável pelo melhor entendimento de como funcionam estes biocatalisadores a nível molecular. Contudo, muito pouco é conhecido sobre a dinâmica das interações destas enzimas, com a interface e com o substrato, sob a influência de um determinado solvente. A importância do emprego de métodos teóricos reside no fato de que é possível, através da observação de trajetórias de microssegundos, “ver” a dinâmica da região do sítio ativo em diferentes solventes. Por outro lado, muitos outros dados experimentais e estruturais ainda são necessários para a melhoria do entendimento sobre a especificidade das enzimas lipolíticas (COSTA, 1999).

A diferença mais importante entre as “verdadeiras” enzimas lipolíticas e outras hidrolases, como as esterases, são as interações físico-químicas com seus substratos. Em contraste com as esterases, que apresentam atividade de Michaelis-Menten normal, ou seja, a atividade da esterase aumenta conforme a concentração do substrato [S] aumenta, até um limite por saturação, as enzimas não apresentam atividade enquanto seus substratos estão presentes na solução em estado monomérico. Contudo, quando a concentração do substrato está próxima ou ultrapassa o seu limite de solubilidade, ocorre um rápido aumento na atividade da enzimas lipolítica. A razão pela qual uma enzima lipolítica não hidroliza substratos que estejam abaixo de uma concentração mínima (a concentração micelar crítica, CMC), porém somente em concentração acima desta, é chamada de ativação interfacial, sendo este mecanismo associado a mudanças conformacionais na enzima (COSTA, 1999).

3.1.2. Vantagens das Enzimas Lipolíticas

As enzimas lipolíticas oferecem benefícios particulares como sua especificidade, condições rápidas de reação e redução dos resíduos gerados. Sendo possível escolher a enzima específica para o controle do produto que está sendo produzido evitando reações secundárias indesejadas. As plantas industriais que utilizam reações enzimáticas podem ser construídas e operadas com um custo de capital e energia muito menor se comparadas aos processos que não utilizam enzimas (HASAN *et al.*, 2006).

De acordo com PANDEY (2000) as enzimas lipolíticas têm sido muito utilizadas como biocatalisador na síntese de compostos quirais, oferecendo tremendo potencial na produção de compostos farmacêuticos de interesse.

A utilização de enzimas lipolíticas pelas indústrias apresenta vantagens como: estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH, facilidade de separação dos produtos e, quando imobilizadas, podem ser submetidas às condições industriais típicas, com reatores a temperaturas superiores a 70°C por longos períodos de tempo (HASAN *et al.*, 2006).

De acordo com a literatura, muitos estudos estão sendo realizados com o intuito de desenvolver novas tecnologias para a otimização dos processos de modificação de óleos e gorduras catalisados por enzimas lipolíticas. Destacando entre eles: a imobilização da enzima utilizando diferentes tipos de suporte; estudos cinéticos e de estabilidade enzimática; modificações químicas; desenvolvimento de bioreatores; estudo da resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica, etc. (MENDES *et al.*, 2005; SOARES, 2000; DALLA-VECHIA *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 1999).

3.1.3. Enzimas Lipolíticas de Origem Microbiana

As enzimas lipolíticas são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação submersa (FSm) e/ou fermentação em estado sólido (FES) usando várias espécies de microrganismos (Tabela 1), tais como os fungos *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp, por leveduras de *Tulopsis* sp e *Cândida* sp e bactérias como *Pseudomonas* sp, *Achromobacter* sp e *Staphylococcus* sp (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). De acordo com SHARMA *et al.* (2001), a maioria das enzimas lipolíticas microbianas industriais são derivadas de fungos e bactérias. As enzimas lipolíticas microbianas são amplamente diversificada nas suas propriedades enzimáticas, substrato e especificidade, o que as tornam muito atraente para aplicações industriais (HASAN *et al.*, 2006).

Tabela 1: Lipase produzidas por diferentes microrganismos.

Fonte	Tipo de Fermentação	Referências
<i>Fusarium solani</i> FS1	FSm	MAIA <i>et al.</i> (1999)
<i>Rhizopus homothallicus</i>	FSm/FES	DIAZ <i>et al.</i> (2006)
<i>Penicillium restrictum</i>	FSm/FES	CASTILHO <i>et al.</i> (2000)
<i>Rhizopus sp</i>	FSm	PASTORE <i>et al.</i> (2003)
<i>Aspergillus niger</i>	FSm	KAMINI <i>et al.</i> (1998)
<i>Candida rugosa</i>	FSm	DALMAU <i>et al.</i> (2000)
<i>Candida rugosa</i>	FSm	FADILOGLU <i>et al.</i> (2001)
<i>Candida rugosa</i>	FSm	RODRIGUES (1997)
<i>Aspergillus niger</i>	FSm	MAHADIK <i>et al.</i> (2004)

Devido a sua grande versatilidade e aplicabilidade há uma crescente procura de novas fontes de enzimas lipolíticas microbianas. Sendo o solo um grande reservatório de população microbiana diversificada, alguns pesquisadores como KO *et al.* (2005) e LIN *et al.*, 1995, vem utilizando desta inesgotável fonte de microrganismos para a seleção de microrganismos capazes de produzir enzimas lipolíticas microbianas. No seu estudo para detecção de microrganismos lipolíticos em solos KO *et al.* (2005), utilizando solo de uma fazenda localizada em Taiwa, observaram que a maior parte dos microrganismos produtores de enzimas lipolíticas encontrados na fazenda foram às bactérias e os fungos, e que estes microrganismos manifestaram boa atividade enzimática.

As enzimas microbianas são muitas vezes mais úteis do que as enzimas derivadas de plantas ou animais devido à sua grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, os possíveis rendimentos elevados, a facilidade na manipulação genética, rápido crescimento microbiano em meio de baixo custo (HASAN *et al.*, 2006).

Os microrganismos apesar da sua versatilidade são bastante sensíveis às condições do ambiente ao qual estão sendo submetidos. Na produção de enzimas lipolíticas microbianas, fatores como composição do meio, temperatura, pH, aeração e a presença de compostos inibidores influenciam no processo, afetando a atividade enzimática. Uma grande variedade de microrganismos tem habilidade de produzir essas enzimas, sendo função de alguns parâmetros reacionais e apresentando diferentes especificidades, massa molecular, sensibilidade à temperatura e pH (BURKERT, 2003).

Segundo HASAN *et al.* (2006), apenas 2% dos microrganismos do mundo têm sido fontes de pesquisas. Entre as fontes de enzimas lipolíticas microbianas as bactérias são amplamente utilizadas nas aplicações biotecnológicas por oferecerem alta atividade comparada às leveduras, por possuírem boas condições operacionais e de armazenamento, além de tenderem à pH neutro ou alcalino, sendo muitas vezes termoestáveis. As manipulações genéticas ou ambientais tendem ao aumento do rendimento das células que por consequência acarreta num aumento da atividade enzimática, tornando a enzima de interesse constitutivo, ou seja, induzindo-a a produzir enzimas alteradas que possam ser facilmente empregadas, devido as suas relativamente simples necessidades nutricionais (JAEGER *et al.*, 1999).

O custo de produção das enzimas lipolíticas microbianas é determinado pela quantidade de enzima produzida, pelo processo de *downstream* utilizado e pela estabilidade enzimática. Dentre os vários fatores que influenciam a produção destas enzimas microbianas durante a fermentação, o substrato utilizado como fonte de carbono e o tipo de indutor tem uma relevância significativa. Isso acontece porque as enzimas lipolíticas têm como função quebrar os substratos lipídicos insolúveis para poderem ser mais facilmente absorvidos já que a maioria das enzimas microbianas são produzidas extracelularmente (SAXENA *et al.*, 1999 apud KANWAR *et al.*, 2002).

3.1.4. Classificação de Enzimas Lipolíticas

De acordo com PAQUES *et al* (2006) e BURKERT (2003), as enzimas lipolíticas são divididas conforme a classificação da enzima, da seguinte forma:

I. Regiosseletivas (Figura 2):

- lipases não-específicas – catalisam a hidrólise de triglicérides em ácidos graxos, que divide-se em: primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2 e glicerol em qualquer posição da estrutura do grupo acil. Como exemplo as lipases produzidas por: *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum* e *Pseudomonas sp*;

- lipases 1,3-específicas - hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, isto é, na posição 1,3 do triacilglicerol; 2-monoglicerídeos e 1-2 ou 2-4 diglicerídeos, ambos quimicamente instáveis, ocorrendo migração do grupo acil produzindo 1,3-diglicerídeos, ou 1- ou 3- monoglicerídeos. Como exemplo as lipases produzidas por: *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus niveus* e *Penicillium roquefortii*.

II. Tipo-seletivas com relação ao tamanho da cadeia carbônica e/ou ao número de insaturação do grupo acila.

III. Enantiosseletivas. Ex: lipases produzidas por *Candida rugosa*.

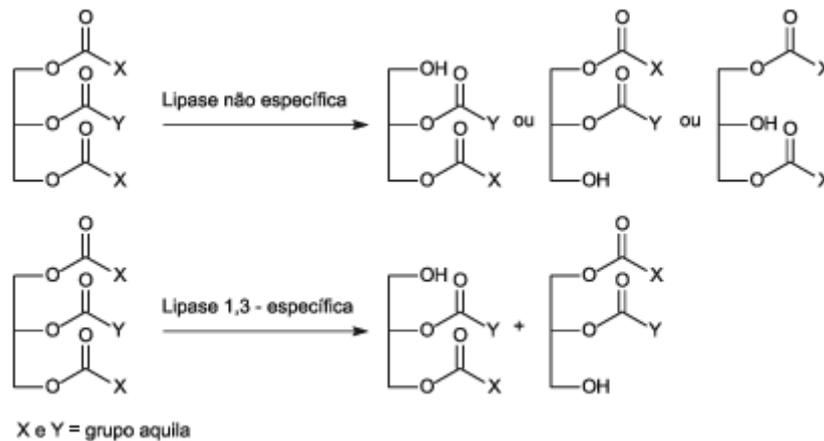


Figura 2: Reações catalisadas por lipases do tipo não-específica e 1,3 específica (PAQUES et al., 2006).

3.1.5. Aplicações das Enzimas Lipolíticas

As enzimas lipolíticas são amplamente utilizadas no processamento de alimentos, produtos farmacêuticos, na síntese de produtos químicos, no tratamento de óleos e gorduras, na fabricação de detergentes, papel, produtos cosméticos, entre outros (GULATI et al., 2005; KADER et al., 2007; SHARMA et al., 2001; MAHADIK et al., 2004 e HASAN et al. 2006).

Dentre os processos bioquímicos reportados na literatura, as enzimas lipolíticas representam cerca de 10% dentre as enzimas empregadas. No entanto, mesmo com uma vasta variedade de enzimas lipolíticas microbianas, o uso dessas enzimas em escala industrial (Tabela 1 e 2) ainda é escasso, devido aos elevados custos de produção (GHANDI, 1997).

Na Tabela 2, apresentam-se diferentes fornecedores para as diversas fontes biológicas para a produção de enzimas lipolíticas.

Tabela 2. Fontes biológicas e seus respectivos fornecedores.

Fonte Biológica	Fornecedor
<i>Achromobacter sp.</i>	Meyto, Sangyo
<i>Aspergillus niger</i>	Aldrich Amano, Biocatalysts Fluka, Novozymes, Rohm
<i>Aspergillus sp.</i>	Novozymes
<i>Candida antártica A</i>	Boehringer, Fluka, Novoenzymes
<i>Candida antártica B</i>	Fluka, Novoenzymes, Boehringer
<i>Candida cylindracea</i>	Meito
<i>Candida rugosa</i>	Aldrich, Altus, Amano Amano, Biocatalysts, Fluka Meito Sangyo, Roche, Sigma
<i>Chomobacterium viscosum</i>	Asahi
<i>Geotrichum candidum</i>	Amano, Biocatalysts
<i>Mucor javanicus</i>	Amano
<i>Mucor miehei</i>	Amano, Biocatalysts, Boehringer Fluka, Novoenzymes
<i>Penicillium roqueforti</i>	Amano, Biocatalysts, Fluka
<i>Pseudomonas sp.</i>	Boehringer, Fluka, Amano Mitsubishi, Rohm, Sigma
<i>Rhizopus arrizhus</i>	Biocatalysts, Boehringer, Fluka, Sigma
<i>Rhizopus oryzae</i>	Amano, Sigma

Fonte: PAQUES *et al.*, 2006

Na Tabela 2.1, apresentam-se alguns exemplos de aplicações industriais de enzimas lipolíticas.

Tabela 2.1: Exemplos de aplicações industriais de enzimas lipolíticas.

Área	Aplicação	Produto
Química		
Detergentes	Remoção de manchas de óleos e gorduras	Detergentes para limpeza
Farmacêutico	Síntese de ésteres	Ésteres e emulsificantes
Cosméticos	Síntese de ésteres	Fragrância para perfumes
Curtume	Remoção de gorduras das peles dos animais	Produtos de couro
Médica		
Exames	Ensaio de triglicerídeos no sangue	Kits de diagnósticos
Alimentação		
Laticínios	Hidrólise de gordura do leite	Aromas para produtos lácteos
Bebidas	Melhoramento do aroma e aceleração da fermentação, por remoção de lipídeos	Bebidas alcoólicas, ex: saque, vinho e outras
Processamento de óleos e gorduras	Transesterificação de óleos naturais Hidrólise de óleos (ácido graxos, diglicerídeos e monoglicerídeos) e gorduras	Óleos e gorduras modificadas (substitutos da manteiga de cacau)

Atualmente o maior empecilho ao uso de enzimas lipolíticas em processos industriais está relacionado ao alto custo deste catalisador, entretanto os recentes avanços na tecnologia de engenharia genética e de modificação e imobilização de enzimas lipolíticas têm grande possibilidade de mudar este quadro num futuro próximo (SAXENA *et al.*, 2003).

Segundo AKOH *et al.* (2007), no futuro as enzimas lipolíticas serão utilizadas como biocatalisadores para conversão de óleos vegetais e gorduras para a produção de biodiesel comercial, uma vez que é mais eficiente e altamente seletiva, implica em menor consumo energético, já que as reações podem ser efetuadas em condições suaves e produz menos produtos secundários, isto é, resíduos, sendo com isso, favorável ao meio ambiente.

A seguir serão apresentados alguns exemplos de aplicações industriais das enzimas lipolíticas.

Tratamento de Efluentes

As enzimas lipolíticas apresentam uma importância particular, pelo fato de hidrolisarem especificamente óleos e gorduras, sendo de grande interesse no tratamento de efluentes com alto teor de gordura (MENDES *et al.*, 2005). São utilizadas nos resíduos de lodo ativado e outros processos aeróbicos, onde finas camadas de gordura devem ser continuamente removidas da superfície dos tanques para permitir a entrada de oxigênio (mantendo assim as condições de vida da biomassa). Esta camada rica em gordura é digerida, por exemplo, por lipases de *Candida rugosa*. Uma efetiva quebra dos sólidos e uma limpeza e prevenção da formação de novas camadas no sistema são importantes para muitas operações industriais, como exemplo, podem ser citados: degradação do lixo orgânico (uma mistura comercial de lipase, celulase, proteases, amilases, nutrientes inorgânicos, sementes de trigo, entre outros são empregados para este fim); tratamento de esgoto; limpeza dos tanques; fossas sépticas, etc.

Indústria de Gordura e Oleoquímica

O uso de enzimas lipolíticas para a hidrólise de gorduras em âmbito industrial proporciona vantagens como a diminuição de gastos com energia e a minimização da degradação térmica durante a alcoólise, acidólise, hidrólise e glicerólise. Estas são provavelmente as principais atrações que levam à substituição das tecnologias químicas atuais pelas biológicas. Devido ao seu valor nutritivo, a não degradação de ácidos graxos poliinsaturados pode ser importante para a preservação de aditivos de alimentos tais como mono e dialciligliceróis, sendo estes últimos, os componentes principais dos novos óleos para cozimento, que tem a proposta de retardar o aumento de triglicerídios e colesterol no sangue (HASAN *et al.*, 2006; SHARMA *et al.*, 2001).

Em âmbito mundial a aplicação das enzimas lipolíticas na indústria oleoquímica está crescendo exponencialmente. Gorduras e óleos são produzidos em todo mundo num nível de aproximadamente 60 milhões de ton/ano sendo que uma parte substancial deste (mais que 2 milhões de ton/ano) consome alta energia em processos como a hidrólise, glicerólise e alcoólise (HASAN *et al.*, 2006).

Indústria de papel e celulose

De acordo com SHARMA *et al.* (2001) os componentes da madeira, principalmente triglicerídeos e ceras, causam graves problemas na fabricação de celulose e papel. As enzimas lipolíticas são utilizadas para a remoção do “pitch” da polpa de celulose no processamento industrial do papel. Para o controle de “pitch” foi desenvolvido no Japão um método que utiliza a lipase fúngica de *Candida Rugosa* para hidrolisar mais que 90% dos triglicerídeos presentes na madeira.

Indústria de Alimentos

De acordo com HASAN *et al.* (2006) nos dias atuais a modificação de óleos e gorduras é uma das primeiras áreas na indústria de processamento de alimento que demanda valores econômicos e tecnologias verdes. Óleos vegetais com estrutura de triacilglicerol adaptadas nutricionalmente e com as propriedades alteradas físico-quimicamente tem um potencial enorme no mercado futuro. Óleos de baixo valor econômico podem sofrer beneficiamento para a agregação de valores nutricionais na estrutura do triacilglicerol como os substitutos da manteiga de cacau, que tem triacilglicerol de baixa caloria e ácido oléico enriquecido com óleos. A manteiga de cacau possui um alto teor de gordura, contêm ácido palmítico e esteárico possuindo um ponto de derretimento de aproximadamente 37°C. O derretimento da manteiga de cacau na boca produz uma sensação de arrefecimento igual aos produtos como o chocolate (SHARMA *et al.*, 2001).

Lipases e proteases têm sido responsáveis pelo desenvolvimento de aromas em queijos e derivados, bebidas alcoólicas, achocolatados e sobremesas, pela hidrólise seletiva de triacilgliceróis e liberação de ácidos graxos, que atuam como flavorizantes ou como precursores destes (JAEGER *et al.*, 1999).

Em consequência dos efeitos do seu metabolismo os ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) são cada vez mais utilizados como produtos farmacêuticos e aditivos alimentares. A maioria dos PUFAs são essenciais para a síntese de membranas lipídicas e prostaglandinas. As enzimas lipolíticas microbianas são usadas para a obtenção de PUFAs de lipídeos animais e de plantas como o óleo de atum e óleo de borage (erva originária da Síria) (SHARMA *et al.*, 2001).

Indústria Têxtil

As enzimas lipolíticas são utilizadas na indústria têxtil para remoção de lubrificantes, a fim de proporcionar um tecido mais absorvente para um melhor tingimento. Algumas vantagens podem ser atribuídas às enzimas lipolíticas no processamento de tecidos sintéticos, dentre elas: alta resistência a manchas, enrugamentos, abrasão e suavidade. Fibras sintéticas como, por exemplo, o poliéster, foram modificadas enzimaticamente para uso na produção de fios, tecidos, tapetes entre outros. (HASAN *et al.*, 2006).

Indústria de Detergentes

Devido à sua capacidade de hidrolizar gorduras as enzimas lipolíticas são largamente utilizadas como aditivos na indústria e como detergentes domésticos. Os detergentes que contêm este tipo de enzima são especialmente selecionados para atender aos seguintes requisitos: baixa especificidade do substrato, ou seja, capacidade de hidrolizar gorduras de diversas composições; resistência à lavagens em condições relativamente duras como pH: 10-11 e Temperatura de 30°C a 60°C e resistência aos danos causados pelas enzimas tensoativas (proteases, muito utilizadas na formulação de detergentes) (HASAN *et al.*, 2006; SHARMA *et al.*, 2001).

De acordo com HASAN *et al.* (2006) a maioria dos detergentes contém ingredientes similares e são baseados em semelhantes mecanismos de ação. Para a otimização dos detergentes modernos foram adicionadas uma ou mais enzimas, tais como, proteases, amilases, celulasas e lipases.

A utilização de enzimas acarreta numa redução da carga ambiental, uma vez que reduz o consumo de energia, pois permite uma lavagem com temperatura mais baixa; a quantidade de produtos químicos utilizados é reduzida; são biodegradáveis, não deixando resíduos nocivos; não causam impactos negativos do ponto de vista dos processos de tratamento de esgoto e não representam risco para a vida aquática, flora e fauna (HASAN *et al.*, 2006).

Indústria de Cosméticos

Retinóides (vitamina A e derivados) são largamente utilizados na indústria de produtos cosméticos e farmacêuticos como produtos de cuidados com a pele. Como

exemplo, pode ser citados derivados de retinol solúvel em água que são preparados por reações catalíticas de lipases imobilizadas (HASAN *et al.*, 2006).

3.2. PROCESSOS FERMENTATIVOS

Os processos fermentativos são um dos métodos mais antigos e extremamente utilizados para a produção de enzimas pelo qual os microrganismos, geralmente bactérias, fungos e leveduras, retiram do meio em que está acondicionado, o material necessário para a sua subsistência, ao mesmo tempo em que as enzimas catalisam substâncias que serão utilizadas em processos industriais. Dentre os processos fermentativos utilizados, têm-se a fermentação submersa, onde o meio pelo qual se desenvolve o microrganismo é líquido e a fermentação em estado sólido onde o meio utilizado, como o próprio nome diz, é sólido.

3.2.1. Fermentação Submersa

A fermentação submersa designa-se como um processo pelo qual utiliza-se um meio fermentativo líquido onde as fontes de nutrientes utilizadas são solúveis, sendo considerado o processo mais utilizado para a produção de enzimas lipolíticas devido à facilidade dos microrganismos de crescerem em condições controladas de pH e temperatura.

A produção de enzimas lipolíticas pode ser realizada em diferentes sistemas, como em escala laboratorial utilizando frascos agitados (como exemplo, erlenmeyers) e agitadores de bancadas, como em escala industrial, utilizando fermentadores industriais. (ELLAIHAH, 2004; KANWAR *et al.*, 2002; MAHADIK, 2004; MAIA, 2001).

Os tipos de fermentadores podem ser operados de forma contínua, semi-contínua ou descontínua. De acordo com PINHEIRO (2006), no regime contínuo há uma constância na entrada de substrato conforme as necessidades do microrganismo e na saída do meio fermentado. Segundo, KOUTINAS *et al.* (2003); SHU *et al.* (2006); LI *et al.* (2001), os processos descontínuos podem ser realizados na forma de batelada, isto é, quando quantidades únicas de substrato são fornecidas ao microrganismo no início do experimento. Este processo é muito utilizado na produção de enzimas lipolíticas, devido

ao seu baixo custo, porém necessita de uma maior vigilância operacional para assegurar a reprodutibilidade e constância das propriedades do produto.

Muitos estudos têm sido empreendidos para definir as necessidades nutricionais e de cultura ideal para a produção de enzimas lipolíticas em fermentação submersa (HASAN *et al.*, 2006). Segundo SANROMÁN *et al.* (2006), o processo de fermentação submersa possui relativa facilidade de cultivo em grande escala, já que garante homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros como pH, temperatura, aeração, umidade e concentração de oxigênio dissolvido no processo, principalmente se monitorados por sensores adequados.

No seu estudo para a produção de lipase extracelular pelo fungo *Fusarium solani* FS1 em fermentação submersa, MAIA *et al.* (1999), utilizaram como meio basal: 1,0g/L de KH_2PO_4 ; 7 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 3g/L de NaNO_3 e 30g/L de peptona, sendo suplementado com diferentes fontes de carbono (glicose, óleo de oliva e peptona). O fungo produziu 10.500U/L de lipase após 72h de incubação à 25°C e agitação de 120 rpm em meio contendo 3% (p/v) de peptona e 0,5% (v/v) de óleo de oliva. Já a glicose (1% w/v) inibiu o efeito estimulador do óleo de oliva.

DIAZ *et al.* (2006), obtiveram uma atividade específica de 203 U/g, por meio do seu estudo de produção de lipase pelo fungo termotolerante de *Rhizopus homothallicus* em fermentação submersa com condições iniciais: 40° C, agitação de 170 rpm, pH de 6,5 e utilizando como meio de cultura: 40 g/L do líquido macerado do milho; 10 g/L de peptona; 14 g/L de KH_2PO_4 ; 2,4 g/L de K_2HPO_4 ; 0,4 g/L de MgSO_4 .

Uma das desvantagens da fermentação submersa em relação à fermentação no estado sólido é o fator econômico, devido aos meios utilizados no preparo da fermentação submersa apresentarem alto custo. SOCCOL *et al.* (2000; 2003), observaram que a fermentação em estado semi-sólido tem como principal vantagem a utilização de meios extremamente baratos, como a possibilidade de uso de resíduos agroindustriais como substrato e a produtividade que este processo apresenta, reduzindo assim o custo de obtenção da enzima. No entanto faltam ainda os mecanismos de controle sofisticados existentes na fermentação submersa, pois na literatura ainda são poucos os modelos de bioreatores disponíveis para fermentação no estado sólido que consigam o controle de parâmetros como pH, temperatura, aeração, umidade e transferência de oxigênio. (SANROMÁN *et al.*, 2006).

3.2.2. Fermentação em Estado Semi-Sólido

O processo de fermentação no estado sólido (FES) pode ser definido como uma técnica de crescimento de microrganismos sobre e no interior de partículas porosas úmidas (suporte ou matriz sólida), onde o conteúdo de líquido contido nesta matriz deve ser mantido a um nível correspondente à atividade de água. Assim, é assegurado o conveniente crescimento do metabolismo celular que não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz. O suporte sólido pode ser constituído por um substrato naturalmente úmido ou por uma matriz inerte capaz de absorver os nutrientes que se encontram em solução reproduzindo as condições de baixa atividade de água e alta transferência de oxigênio (PANDEY, 1999).

A fermentação no estado sólido apresenta as seguintes vantagens: simplicidade de meio de cultura; redução dos efluentes líquidos a tratar; redução das contaminações resultantes da baixa umidade do meio fermentativo; condições de cultura próximas aos meios naturais; para as fermentações tradicionais, a microflora do suporte serve como inóculo; fácil aeração devido à porosidade do material; utilização direta dos sólidos fermentados; extração facilitada pela alta concentração de produtos; volume do fermentador menor do que o da cultura líquida; baixa demanda de energia (SPIER, 2005).

Além das vantagens, a FES também apresenta algumas desvantagens como: risco de elevação excessiva de temperatura (problemas de transferência de calor e de perda de umidade para as fermentações mais longas); difícil regulação dos parâmetros de cultura (por exemplo: pH e umidade); pré-tratamento dos suportes (umidificação, homogeneização, dispersão, tratamento térmico e enzimático); alta taxa de inoculação, quando não se utiliza a microflora natural; estimação precisa de biomassa; papel essencial da umidade e da atividade de água (SPIER, 2005).

SOCCOL, *et al.* (2000), no seu estudo da utilização de fermentação sólida na síntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*, utilizaram como substrato bagaço de cana; casca de café e bagaço de mandioca numa temperatura de 26°C durante 120 horas, chegando a uma produção máxima de ácido cítrico de 88,1 g/kg.

3.3. INFLUÊNCIA DO MEIO NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS

As inúmeras variáveis que envolvem o processo de obtenção da enzima vão desde a composição do meio (fonte de carbono, fonte de nitrogênio, sais e indutores) quanto

às condições operacionais como pH, temperatura, agitação e aeração (BURKERT *et al.*, 2003). Isto ocorre, segundo AQUARONE *et al.* (2001), devido à estrutura e a forma do sítio ativo da estrutura tridimensional da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura protéica.

3.3.1. pH

Entre os parâmetros físicos-químicos, o pH do meio de crescimento desempenha um papel importante por induzir mudanças morfológicas no organismo e também para a secreção enzimática. A mudança de pH observada durante o crescimento de um organismo também afeta a estabilidade do produto no meio. Em processos com fungos, a capacidade tamponante de alguns constituintes do meio em alguns casos elimina a necessidade de controle do pH (GUPTA *et al.*, 2003).

De acordo com PINHEIRO (2006), cada microrganismo apresenta um valor de pH ótimo para o crescimento que muitas vezes não é o mesmo para a produção de lipases. Entretanto, é possível que ocorram variações nos valores de pH durante o cultivo, os quais podem ser influenciados tanto pelo microrganismo e pela composição do meio, quanto pelos demais parâmetros da fermentação.

PASTORE *et al.* (2003), no seu estudo para purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp*, testou para o efeito do pH na atividade enzimática, diferentes soluções tampões com variadas faixas de pH: tampão acetato de sódio: pH= 3,6; 4,0; 4,5; 5,0 e 5,6; tampão fosfato de sódio: pH=6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 e tampão Tris-HCl: pH=8,0; 8,5 e 9,0. Após análises do extrato bruto contendo os três tampões diferentes, chegou-se a conclusão que a maior atividade enzimática estava presente na faixa de pH entre 6,0 e 6,5.

3.3.2. Temperatura

A influência da temperatura sobre a cinética da reação enzimática deve ser entendida em duas fases distintas: em princípio, aumentos de temperatura levam a aumentos de velocidade de reação, por aumentar a energia cinética das moléculas dos componentes do sistema, aumentando a probabilidade de choques efetivos entre elas. Esse efeito é observado em um intervalo de temperatura compatível com a manutenção da estrutura espacial da enzima. Temperaturas mais altas levam à desnaturação da enzima, um dos motivos para a elevação da temperatura é a agitação mecânica, etc.

Temperaturas elevadas causam a perda da estrutura nativa, catalítica, das enzimas por alterarem as ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional. A desnaturação é causada pelo rompimento das pontes de hidrogênio, que são ligações bastantes termolábeis, desencadeando-se uma cascata de alterações estruturais, levando a enzima a uma nova conformação ou a um estado sem estrutura definida; a enzima é dita, desnaturada. A temperatura que provoca desnaturação naturalmente varia para cadeia, mas, geralmente, está pouco acima da sua temperatura ótima (AQUARONE *et al.*, 2001).

Os efeitos da temperatura na atividade enzimática foram testados por KAMINI *et al.* (1998), no seu estudo para produção de lipase por *Aspergillus niger*, em fermentação no estado sólido utilizando bagaço de gengibre. As temperaturas utilizadas foram de 25 a 60°C. Onde os resultados apresentaram uma produtividade ótima da enzima à temperatura de 37°C. Já CASTILHO *et al.* (2003), estudaram a purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp*, as temperaturas foram de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 e 70°C. Chegando-se a conclusão que a temperatura ótima para a lipase bruta é de 40° C, mantendo 50% ou mais de sua atividade entre 40 e 55°C.

3.3.3. Fonte de carbono

Inúmeras fontes de carbono podem ser citadas para o cultivo de microrganismos para a produção de enzimas, dentre elas, fontes sintéticas: glicose, xilose, maltose, lactose, sacarose, avicel, carboximetilcelulose, xilano de aveia, pectina de citrus, glicerol, glicose etc e fontes naturais: bagaço de cana, bagaço de laranja, farelo de aveia, farelo de trigo, óleo de soja, óleo de pescado, borra de óleo de soja, etc (KNOB *et al.*, 2007).

Para a produção de lipase por *Penicillium restrictum* GOMBERT *et al.* (1999) observou que pequenas variações nos níveis de nutrientes (fontes de carbono e nitrogênio) exercem grande influência na quantidade de enzima obtida e que, o meio basal, ao ser enriquecido diferentemente, pode proporcionar a produção de enzimas variáveis.

DALMAU *et al.* (2000), analisando os efeitos das fontes de carbono na produção de lipase por *Candida rugosa* utilizaram um meio basal: 15 g/L de KH_2PO_4 , 5,5 g/L de K_2HPO_4 , 5 g/L de $\text{Mg SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L de NaCl , 0,1 g/L de CaCl_2 . As fontes de

carbono utilizadas para uma concentração de 2g/L foram: ácido oléico, ácido palmítico, Tween 80 e trioleína. Após os testes foi verificado que o ácido palmítico foi o melhor indutor para a produção da enzima nas condições de 30°C, 150rpm em 48 horas de fermentação, gerando cerca de 5,3 U/mL.

As fontes de carbono parecem ser essenciais para a obtenção de um alto rendimento de lipases, no entanto alguns autores têm produzido bons rendimentos na ausência de gorduras e óleos, sendo estes substituídos por glucose e ácido oléico. (SHARMA, 2001).

3.3.4. Fonte de nitrogênio

Segundo BECKER *et al.*(1997), as fontes de nitrogênio já presentes num meio de cultura (depende dos compostos inseridos no meio) contêm algumas, senão todas as vitaminas necessárias para o metabolismo do microrganismo. Porém, existem casos onde alguma vitamina ou uma suplementação é necessária para o crescimento celular.

FADILUĞLU *et al* (2001), no estudo dos efeitos das fontes de carbono e nitrogênio na produção de lipase por *Candida rugosa*, utilizaram como fonte de carbono: glucose e frutose e como fonte de nitrogênio: extrato de levedura, triptona, e protease-peptona. A fermentação foi monitorada por 72 horas e foram avaliados os efeitos do material lipídico na produção de lipase com e sem azeite de oliva, em diferentes composições das fontes de carbono e nitrogênio. A maior atividade da lipase foi observada no meio que continha o azeite de oliva como indutor e extrato de levedura e protease-peptona como fonte de nitrogênio. Os autores chegaram a conclusão que os melhores resultados foram no meio onde possuía o óleo de oliva como fonte de carbono, na presença de fontes de nitrogênio.

3.3.5. Agitação

Com base na literatura, muitos estudos vêm demonstrando que a agitação e a aeração são parâmetros que influenciam diretamente na produção de enzimas lipolíticas.

DIAZ *et al.* (2006), na produção de lipase do fungo termotolerante de *Rhizopus homothallicus* em fermentação submersa utilizaram pH 6,5, temperatura de 40° C e uma velocidade de agitação de 170 rpm obtendo com esses parâmetros uma atividade lipolítica máxima de 50 U/mL. Enquanto SHU *et al.* (2006), obtiveram uma atividade lipolítica máxima de 26 U/mL utilizando lipase de *A. cinnamomea* a uma velocidade de agitação de 150 rpm, temperatura de 28° C e pH 4,0.

Na produção de lipases ácidas pelo microrganismo mutante de *Aspergillus niger* NCIM 1207 em fermentação submersa MAHADIK *et al.* (2004), utilizaram uma velocidade de agitação que variou entre 150 e 180 rpm, à 30°C e pH 5,5, atingindo uma atividade lipolítica máxima de 25,8 U/mL. TUMANG *et al.* (2006), utilizando fermentação submersa para a produção de uma lipase de *Yarrowia lipolytica* com uma agitação de 160 rpm, numa temperatura de 30° C e pH 6,0 obteve uma atividade lipolítica de 1200 U/L.

3.4. INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE SURFACTANTES NA FERMENTAÇÃO PARA PRODUZIR ENZIMAS LIPOLÍTICAS

A adição de surfactantes no meio de cultura tem sido amplamente utilizada para desses surfactantes pode ocasionar alterações na permeabilidade da parede celular ou efeito do surfactante na estrutura da enima (SAXENA *et al.*, 1999 e CORZO *et al.*, 1999).

3.4.1. Triton X

De acordo com ROCHA (1999), o aditivo Triton X-100 é um agente tensioativo, não iônico, com a porção hidrofílica constituída por uma cadeia de polioxietileno com um número médio de 10 unidades de óxido de etileno, e com a porção hidrofóbica formada pelo grupo p-t-octilfenil. Os átomos de oxigênio da porção hidrofílica (poliéter) tornam-na solúvel em água devido à possibilidade de formação de ligações de hidrogênio.

A influência efetiva do Triton na produção de enzima pode está relacionada com a sua polimerização e sua estrutura fracionada indicando que o Triton desempenha um

papel específico (LIN *et al.*, 1995). No estudo do efeito do Triton X-100 na produção de lipase alcalina por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111, foram adicionados na preparação do meio de cultura, 4% de óleo de oliva, 1% de substrato de soja, 1,5% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,3% de K_2HPO_4 , 0,04% de $MgSO_4 \cdot H_2O$, 1% de $NaCO_3$, a uma temperatura de 30°C e velocidade de 200 rpm. Diferentes concentrações de Triton X-100 foi testada, chegando a uma de atividade lipolítica máxima de 95 U/mL com adição de 0,2% de Triton X-100. Nas outras concentrações (0,1; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0%) a atividade ficou entre os valores de 60 U/mL em 0,3% até chegar a 0% com a adição de 1% de Triton X-100. Neste caso, o autor concluiu que a adição de pequenas concentrações de Triton X-100 é mais eficaz na produção de enzimas lipolíticas. Outros tipos de Triton X foram testados entre eles o: X-15; X-45; X-200; X-305, sendo que a atividade enzimática foi muito mais baixa ou nenhuma em comparação com o X-100.

DIAZ *et al.* (2006), detectaram diferenças, tais como a atividade específica; estabilidade térmica e especificidade dos ácidos graxos na produção de lipases. Segundo os autores essas diferenças podem ter acontecido devido à presença de algumas moléculas de Triton X-100 que foi utilizado no processo de recuperação de lipases produzidas por fermentação no estado sólido.

FUCINOS *et al.* (2005), utilizaram o Triton X-100 para a lavagem de enzimas utilizando o método de renaturalização em SDS-gel, que consiste na lavagem por 20 minutos a uma temperatura de 65°C numa solução contendo 20mM de uma solução tampão de Tris-HCL (pH 80), contendo 0,5% (w/v) de Triton X-100.

GESSESSE *et al.* (2003), apresentaram um método de extração de lipases e proteases a partir de lamas ativadas usando o detergente não iônico Triton X-100, o EDTA, e a resina de troca catiônica (CER), de forma isolada ou combinada. Demonstrando que a maior atividade lipolítica foi extraída com a adição de 0,1% de Triton X-100, sendo que a atividade foi diminuindo gradativamente. Já para as proteases, a maior atividade foi obtida na presença de 0,5% de Triton X-100 e não foi observado nenhum decréscimo na atividade.

3.4.2. Tween

O Tween 80 (polioxietileno sorbitano monooleate) é geralmente considerado como um surfactante que pode ser utilizado como substrato para a produção de lipases e

esterases. Em trabalhos recentes o Tween 80 tem demonstrado ser uma poderosa fonte de carbono para a produção de lipases microbianas, podendo também diminuir significativamente o tempo da fermentação (DALMAU *et al.* (2000), LI *et al.*, 2001).

Para a produção da lipase de *Acinetobacter radioresistens* tendo como fonte de carbono o Tween 80, LI *et al.* (2001), utilizaram como meio de cultura: 10g de triptona; 5g de extrato de levedura; 10g de NaCl; 1g de NH₄Cl e com variação das concentrações de Tween 80: 0,1%, 0,2%, 0,3% e 0,4% (v/v). Como condições de fermentação: pH 7,0; temperatura de 30°C e agitação de 400 rpm. Obtendo uma atividade lipásica máxima de 25 U/mL em 6 horas de fermentação com 0,3% de Tween. Chegando a conclusão que grandes concentrações de Tween 80 podem reprimir a síntese da lipase.

O Tween também pode ser utilizado para identificação da produção de enzima. Segundo SHARMA *et al.* (2001), no seu estudo para produção, purificação, caracterização e aplicação de lipases, perceberam que a presença de Tween 80 forma zonas opacas ao redor das colônias, o que é um indicativo da produção de lipase por organismos e que presente no meio de cultura altera relativamente a abundância das várias formas de lipase no meio comparadas quando o aditivo não é usado.

3.4.3. PEG (Polietileno-glicol)

As modificações químicas causadas pelos derivados de polietilenoglicol (PEG) nas enzimas e outras moléculas bioativas podem eliminar alguns inconvenientes das biomoléculas ou dar novas funções nos processos biotecnológicos. O aditivo PEG torna-se solúvel e ativo em solventes orgânicos a fim de que as reações reversas de hidrólise procedam de forma eficaz, não só em meio orgânico, mas também em qualquer solvente, incluindo a síntese de ésteres (MATSUSHIMA, 2004).

NOEL *et al.* (2003), estudaram o efeito do polietileno-glicol (PEG) sobre a estabilidade da lipase de *Rhizomucor miehei*, detectando através de um scanner de varredura a existência de dois mecanismos exclusivos do PEG, que levam a estabilização e a desestabilização da lipase de *Rhizomucor miehei*.

CARPENTER *et al.* (1993), constataram que o uso do PEG (Polietileno glicol) durante a liofilização protege plenamente as enzimas dos processos de congelamento e desidratação. No estudo, os autores chegaram à conclusão que soluções de até 1-10%

(peso/v) de PEG protegeram as enzimas de dehidrogenase e fosfofrutoquinase durante os processos de congelamento e descongelamento.

3.5. PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

De acordo com FEDATTO (2004), o objetivo da purificação de enzimas é o isolamento das enzimas específicas a partir de um extrato bruto de células contendo muitos outros componentes, de forma a se obter o máximo de atividade específica (unidade enzimática por mg de proteína) com a melhor recuperação possível da atividade inicial.

O êxito da otimização das enzimas depende geralmente do desenvolvimento eficiente dos métodos de separação e purificação. Diferentes técnicas têm sido utilizadas para a purificação de lipases e outras enzimas, entre elas destaca-se a técnica de precipitação onde é aplicado o sulfato de amônio. Devido ao seu baixo custo, alta solubilidade e pela sua proteção natural das enzimas. No entanto, algumas outras técnicas como extração do micélio utilizando surfactantes e cromatografia de troca iônica, estão ganhando importância nos últimos anos (KANWAR *et al.*, 2006). De acordo com DIAZ *et al.* (2006), os progressos nos estudos sobre as propriedades moleculares da lipase têm sido limitados devido à falta de procedimentos experimentais adequados para obtenção de uma enzima altamente purificada.

Existem diversos métodos utilizados para a separação de proteínas. LEHNINGER (1993) classifica os métodos da seguinte forma:

- a) Processos de separação baseados em peso molecular: diálise e ultrafiltração; centrifugação em gradiente de densidade; cromatografia de exclusão molecular;
- b) Processos de separação baseados nas diferenças de solubilidade: precipitação isoelétrica; solubilização e/ou precipitação das proteínas por salificação (*salting-in* e *salting-out*); fracionamento por solventes;
- c) Processos de separação baseados na carga elétrica da molécula;
- d) Separação de proteínas por adsorção seletiva;
- e) Separações baseadas na especificidade de ligantes: cromatografia por afinidade.

O método de separação por precipitação de enzimas por salificação (*salting-out*) é um método acessível e de baixo custo. Em concentrações reduzidas, os sais aumentam a solubilidade de muitas enzimas (proteínas), um fenômeno denominado solubilização por salificação (*salting-in*) isso ocorre devido aos íons ficarem em volta das proteínas (íons de carga oposta), resultando numa diminuição da energia eletrostática e num aumento da atividade do solvente que por sua vez leva ao aumento da solubilidade do solvente USA (2004a; 2004b). Por outro lado, à medida que a força iônica é aumentada, isto é, a quantidade de íons de sal aumenta, a solubilidade do solvente diminui causando a redução gradativa da proteína. Com forças iônicas suficientemente elevadas, uma proteína pode ser quase completamente precipitada de sua solução, um efeito denominado precipitação por salificação (*salting-out*) (LEHNINGER, 1993; USA (2004a).

A técnica de precipitação por sulfato de amônio é a mais utilizada em *salting out* de proteínas, devido a algumas vantagens apresentadas além das que já foram citadas por KANWAR *et al.* (2006), como:

- A precipitação da maioria das proteínas ocorre em uma molaridade suficientemente alta;
- Não promove o aquecimento da solução;
- A solução saturada (4,04 M a 20°C) apresenta uma densidade (1,235 g/cm³) que não interfere na sedimentação da maioria das proteínas durante a centrifugação;

A precipitação faz com que as proteínas sejam separadas pela conversão de proteínas solúveis para um estado insolúvel. O que se busca com a precipitação é a remoção de contaminantes não protéicos e a remoção de proteínas que não sejam as de interesse. O sulfato de amônio por reduzir o volume acaba concentrando mais as proteínas (FEDATTO, 2004).

ABBAS *et al* (2002) com a finalidade de estudar o isolamento e a caracterização de uma lipase extracelular de uma cepa isolada de *Mucor sp* de palma de frutas, utilizaram para a precipitação da proteína 75% de sulfato de amônio (w/v) a 0° C. Obtendo uma atividade lipolítica específica de 129 U/g e um rendimento total de 99%. Uma atividade específica aproximada foi verificada no estudo de CASTILHO *et al* (2003) para purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular

produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp*, onde utilizaram o sulfato de amônio a 70% para a precipitação e obtiveram uma atividade específica de 103 U/g.

DIAZ *et al.* (2006), para o procedimento de purificação de lipase do fungo *Rhizopus homothallicus*, adicionaram no meio de cultura uma concentração de 1M de sulfato de amônio, sendo o pH do meio ajustado para 8,0. O meio de cultura foi centrifugado a 10,000 x g por 25 minutos com temperatura de 4° C. O sobrenadante foi aplicado numa coluna de butil-sepharose (2,5cm x 30cm) equilibrada com 20mM de tampão tris-HCL (pH 8,0) contendo 1M de sulfato de amônio (tampão A). A coluna foi lavada dez vezes com a solução tampão A para remover qualquer material que não fosse proteína. As lipases foram diluídas num gradiente de concentração de sulfato de amônio que variou de 1 a 0M em 20mM do tampão tris-HCL (pH 8,0) ao longo de colunas sendo 10 mL das frações coletados numa taxa de 2 mL/min. As frações da amostra contendo atividade lipásica passaram finalmente por um cromatógrafo contendo uma solução de 10mM de tris-HCL (PH 8,0) e 150mM NaCL, a 1 mL/min. Todos os passos da purificação ocorreram a 4°C, sendo as frações que continham atividade lipásica foram armazenadas a -20°C. A atividade lipolítica aumentou com a biomassa, atingindo o máximo no final da fase exponencial de crescimento, decrescendo em seguida, atingindo o valor máximo de 50 U/mL em 22 horas de fermentação, o que corresponde a cerca de 6 mg/L de enzima pura.

Estudando uma nova técnica de precipitação por sulfato de amônio tendo como agente biológico produtor de lipase a espécie *Pseudomonas G6* e como substrato o n-alcano, KANWAR *et al.* (2006), adicionou ao sobrenadante do seu meio de cultura silicone 21 (uma emulsão composta por 30% de água e 0,979g d₄²⁰) com uma concentração final de 0,1% (w/v) e centrifugado por 30 min. O pH do sobrenadante foi ajustado para 6,0 onde foi adicionado sulfato de amônio com 60% de saturação a 4°C. Chegando a conclusão que a pré-purificação utilizando o silicone 21 com a concentração de 0,1% (w/v) antes da adição do sulfato de amônio melhorou em 24% na recuperação de lipases em comparação com as amostras sem o silicone 21. Chegando a uma atividade específica de 20,10 U/g, resultado similar ao método sem silicone. Segundo o autor, o silicone 21 é basicamente um surfactante que tem por função levar a proteína precipitada para o topo da fase aquosa através da solubilização micelar, sem a necessidade de uma nova centrifugação para uma melhor separação.

3.6. SECAGEM DE ENZIMAS

A secagem é um processo amplamente empregado na transformação de materiais bioativos, como: gêneros alimentícios, laticínios, remédios, suspensões químicas e bioquímicas que contêm enzimas, proteínas, anticorpos e vitaminas. Pode ser considerada como uma técnica de preservação, por meio da qual a atividade de alguns componentes biológicos pode ser preservada por um longo período de tempo (CHEN *et al.*, 2007). Segundo FRANKS (1998), uma série de reações químicas em soluções aquosas podem ocorrer com algumas substâncias como peptídeos, proteínas e moléculas orgânicas com complexos sintéticos, muitas das quais são completamente inaceitáveis em termos de segurança e desempenho do produto, já que reduz a atividade específica da enzima e causa oxidação.

A secagem por infravermelho é baseada na radiação de ondas infravermelhas, a partir de uma fonte, que interage com a estrutura interna da amostra, aumentando assim a sua temperatura e favorecendo a evaporação do teor de umidade. Além disso, a energia do infravermelho é transferida do elemento aquecido para a amostra do produto sem circulação de ar. Assim, a temperatura radiante das camadas da amostra é mais elevada do que o ar que a rodeia. Como resultado, a secagem da amostra é feita tanto no interior quanto no exterior da amostra, por meio dos fenômenos térmicos da radiação e da convecção. Levando a uma alta taxa de calor comparado à secagem convencional (CELMA, 2008).

Enquanto GLOUANNEC *et al.* (2003) defini o infravermelho como um modo superficial de aquecimento, que permite uma imediata e significativa fonte de energia para o produto, otimizando o processo com a redução do tempo de secagem e dos custos.

Em seu estudo experimental da secagem por infravermelho-convectivo de sulfato ferroso hidratado, GLOUANNEC *et al.* (2003) afirma que uma alta potência do infravermelho torna possível aumentar consideravelmente a perda de massa no menor tempo possível. Mas que pode envolver importantes gradientes de umidade no produto, com a formação de uma crosta sobre a superfície da água que impede a migração no interior deste produto. A secagem realizada com infravermelho de baixa potência permite uma melhor homogeneidade do produto, contudo há um aumento do tempo de secagem. Para melhorar a qualidade da secagem, o produto deve possuir uma camada

final ou a variação da potência do infravermelho durante a secagem pode ser uma solução para encurtar o tempo desta.

De acordo com CHUA *et al.* (2003), a intensidade do calor liberada pela luz infravermelha pode ser selecionada de modo que a maior intensidade de calor gerado pelo infravermelho é empregada na entrada do túnel com a diminuição do fluxo de calor ao longo da direção da câmara do túnel. O autor afirma que as lâmpadas de infravermelho podem operar de forma intermitente. Alternativamente, a frequência das luzes de infravermelho pode ser regulamentada de forma a que os produtos que entram na câmara recebam maior frequência de infravermelho possível, sendo a periodicidade da intermitência gradualmente reduzida.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos empregados no desenvolvimento do estudo de produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolados de solo com histórico de contato com petróleo, por meio de fermentação submersa. Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB), no Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), na Universidade Tiradentes (UNIT).

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Microrganismo

A bactéria Biopetro 4 empregada no presente trabalho, pertence ao Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e foi isolado de um solo contaminado por petróleo na região do campo de exploração de petróleo de Carmópolis no Estado de Sergipe. Esta bactéria foi pré-selecionada através de estudos, feitos anteriormente pelo grupo de pesquisa de Engenharia de Bioprocessos do ITP, nos quais detectou-se que a bactéria Biopetro 4 apresentava o maior potencial produtor de enzimas lipolíticas dentre as estudadas. O microrganismo foi preservado em tubos com ágar nutriente inclinado e estocados a 4°C, no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB) do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP).

4.1.2. Reagentes

Os principais reagentes utilizados foram: Acetona (Quimex, Brasil); Ácido Clorídrico (F. Maia, Brasil); Ácido Sulfúrico (Quemis, Brasil); Albumina Bovina (Inlab, Brasil); Azeite de Oliva (Carbonel, Brasil); Biftalato de Potássio (Synth, USA); Carbonato de Sódio (Dinâmica, Brasil); Fenolftaleína (Dinâmica, Brasil); Folin Ciocalteau (Haloquímica, Brasil); Goma Arábica (Cromoline, Brasil); Hidróxido de Sódio (Nuclear, Brasil); Iodeto de Potássio (Incasa S/A); Iodo (Synth, USA); Óleo de Palma (Mercado local); PEG (Synth, USA); Sulfato de Cobre (Quimex, Brasil); Sulfato de Amônio (Synth, USA); Tartarato Duplo de Sódio e Potássio (Neon, Brasil); TRITON-X (Fisher Scientific, USA); TWEN 80 (Synth, USA);.

4.1.3. Equipamentos

- Principais equipamentos utilizados durante a execução do estudo: Agitador (Marconi); Agitador Magnético (Quimis); Autoclave (Marconi); Balança Analítica (Mettler Toledo); Bomba à Vácuo (Marconi); Capela (Marconi); Centrífuga (Quimis); Dessecador (Marconi); Espectrofotômetro (Hach); Estufa para Secagem (Quimis); Liquidificador (Astro Predileta); Liofilizador (Freezone 4.5); pHâmetro (Marconi); Shaker em Banho Termostático (Nova Ética); Shaker (Marconi).

4.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

O procedimento experimental para a produção de enzimas lipolíticas utilizando a bactéria Biopetro 4 desde a obtenção do inóculo à secagem são apresentados nesta seção. O esquema apresentado na Figura 4.2, representa as etapas envolvidas na produção das enzimas: seleção da melhor concentração do indutor óleo de palma; planejamento de experimentos para a determinação das condições ótimas de pH e temperatura; verificação do melhor aditivo a ser utilizado com a análise da melhor atividade lipolítica encontrada; método de purificação utilizando *salting-out* com a utilização da melhor concentração da solução de sulfato de amônio e por fim o método de secagem de enzimas para a verificação da melhor temperatura e pressão.

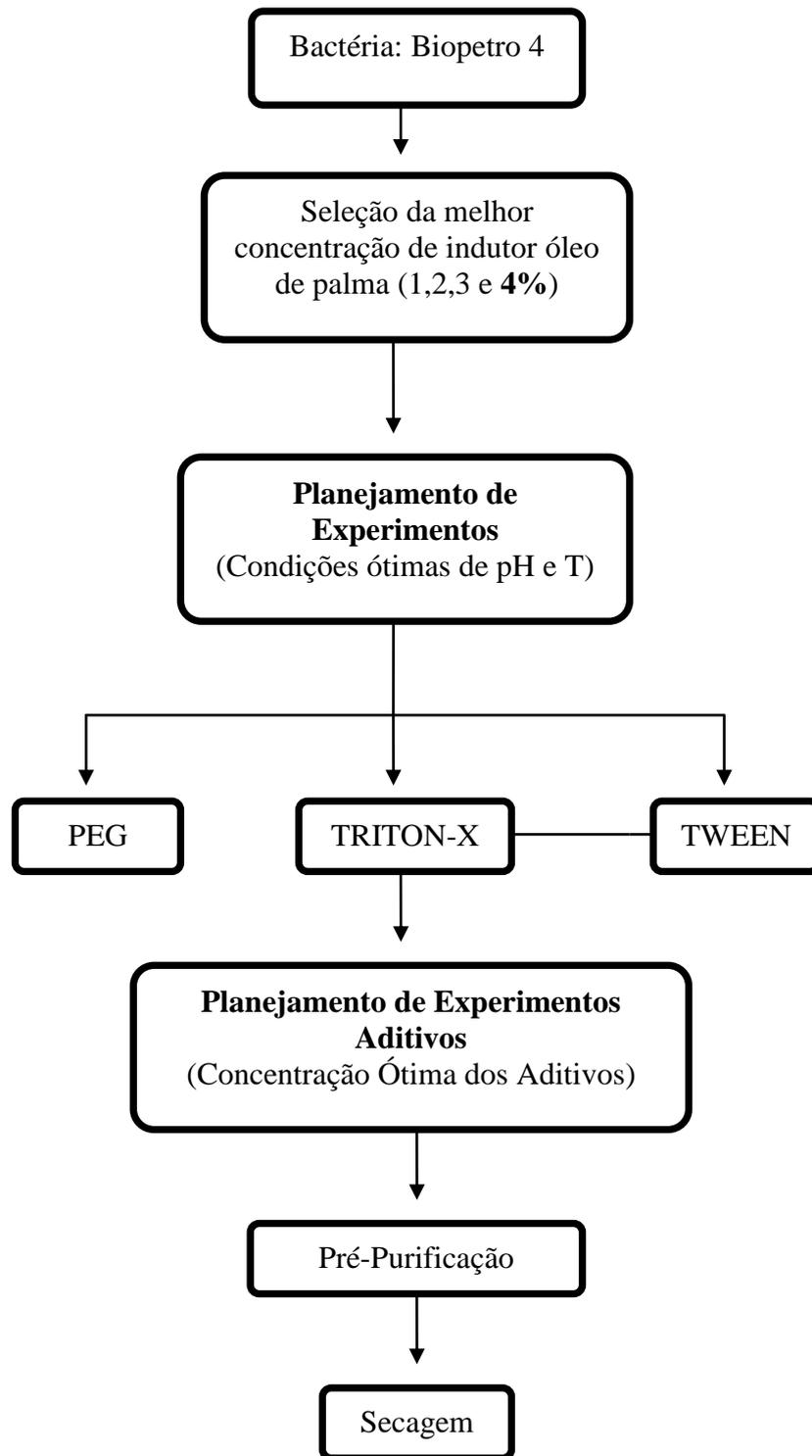


Figura 3: Fluxograma do processo de obtenção de enzimas lipolíticas.

4.2.2. Fermentação submersa

A fermentação foi conduzida em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 125 mL de meio de cultura de meio (Tabela 4) e diferentes concentrações de óleo de coco como indutor acrescido após 48h de fermentação. Os frascos foram agitados a 170 rpm e temperaturas de 24°C, 30°C e 37°C , em agitador orbital tipo shaker durante 144 horas. Em alguns experimentos foram adicionados surfactantes (PEG 1500, Tween 80 ou Triton X-100) e os valores iniciais de pH da fermentação foram 3,0; 5,0 e 7,0. O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm e 121°C por 15 minutos. Os frascos foram inoculados com 10% de volume de inóculo com 48 h de idade.

Tabela 4. Meio de Cultura

Meio de Cultura	Composição (% w/v)
Amido (Synth, USA)	10
Extrato de Levedura (Himedia, Índia)	3,0
KH ₂ PO ₄ (Synth, USA)	0.5
NaNO ₃ (Dinâmica, Brasil)	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O (Synth, USA)	0.25
Peptona Bacteriológica (Himedia, Índia)	0.65

4.2.3. Influência da concentração do indutor óleo de coco

Para avaliar a influência da concentração do óleo de coco como indutor na produção das enzimas lipolíticas pela bactéria Biopetro 4, foram realizadas fermentações com concentrações de óleo de coco entre 1 a 4% (v/v).

4.2.4. Influência do pH e da temperatura

Para avaliar a influência do pH e da temperatura na produção das enzimas lipolíticas pelo microrganismo selecionado, foi adotada a metodologia do planejamento de experimentos empregando uma matriz 2² com três pontos centrais (Tabela 4.1). Em todo o planejamento foi utilizado o mesmo meio de cultura, contendo 4% de óleo de coco, como indutor, acrescido após 48 horas de fermentação.. Os experimentos foram feitos em triplicata.

Tabela 4.1: Matriz do planejamento fatorial 2² empregado no estudo da influência da temperatura e do pH.

Ensaio	Níveis Codificados das Variáveis		Valores Reais das Variáveis	
	X ₁	X ₂	pH	
1	-1	-1	3,0	24
2	+1	-1	7,0	24
3	-1	+1	3,0	37
4	+1	+1	7,0	37
5	0	0	5,0	30
6	0	0	5,0	30
7	0	0	5,0	30

X₁: Valores codificados para o pH.

X₂: Valores codificados para a Temperatura.

4.2.4. Influência da adição de aditivos

Para um melhor desempenho da produção de enzimas lipolíticas foram testados os surfactantes PEG 1500, Triton X e Tween na proporção de 1% em relação à quantidade do meio de cultura. O pH do meio e a temperatura utilizadas neste experimento foi a que rendeu os melhores resultados no item 4.2.3. Após a seleção dos melhores aditivos, realizou-se um planejamento de experimentos para a verificação a melhor concentração dos aditivos selecionados Triton-X e Tween, empregando uma matriz 2² com três pontos centrais (Tabela 4.2).

Em todo o planejamento foi utilizado o mesmo meio de cultura, variando a concentração do aditivo, contendo 4% de indutor óleo de coco acrescido após 48 horas de fermentação com uma rotação de 170 rpm. As outras etapas do experimento seguiram conforme as fermentações anteriores.

Tabela 4.2: Matriz do planejamento fatorial 2² empregado no estudo da influência da temperatura e do pH.

Ensaio	Níveis Codificados das Variáveis		Valores Reais das Variáveis	
	X ₁	X ₂	Aditivos	Concentração (%)
1	-1	-1	Triton	0,2
2	+1	-1	Tween	0,2
3	-1	+1	Triton	1,0
4	+1	+1	Tween	1,0
5	-1	0	Triton	0,6
6	+1	0	Tween	0,6
7	-1	0	Triton	0,6
8	+1	0	Tween	0,6

X₁: valores codificados para os aditivos

X₂: valores codificados para concentração do aditivo

4.2.5. Pré-purificação enzimática

Para a obtenção da enzima pré-purificada foi utilizado o método de precipitação por *salting out*. O caldo fermentado por 144 h foi centrifugado para eliminação das células bacterianas e do óleo de coco residual. Neste caldo livre de célula e óleo foi acrescidos sulfato de amônia em percentuais de saturação de 40%, 50%, 60%, 70% e 80%. O meio precipitado foi novamente centrifugado por 20 min a 1200 rpm e separado o meio sobrenadante e o precipitado. Análises de concentração de proteínas e atividade lipolípica foi realizada nas fases separadas.

4.2.6. Secagem Enzimática

A secagem das enzimas lipolíticas foi realizada por meio de um secador infravermelho de ondas curtas (0,7 a 1,3 μm). Os experimentos foram conduzidos com temperaturas da fonte de aquecimento infravermelho (IV) de: 40°, 65° e 80°C. O extrato pré-purificado utilizado foi composto pelo meio de cultura cuja formulação encontra-se apresentada na Tabela 4.2 com a adição do aditivo Triton X-100.

A operação de secagem foi feita em duas etapas: uma etapa de secagem propriamente dita precedida por uma etapa inicial de estabilização do sistema térmico, na qual o equipamento era ligado e o sistema de aquecimento infravermelho regulado

para que atingisse a temperatura de operação desejada. Após a estabilização da temperatura, uma placa de Petri contendo 10 mL do material foi exposta à radiação, tendo assim início o processo de secagem.

Para a obtenção das curvas de secagem pesagens do material foram feitas em intervalos de tempo pré-determinados. Ao final de cada experimento a massa de sólido seco foi determinado pelo método da estufa a 105°C.

A partir dos resultados de umidade e tempos obtidos ao longo de cada experimento foram traçadas curvas de secagem de unidade adimensional em função do tempo, através das quais foi feito uma análise da influência da temperatura sobre a cinética de secagem do material.

Uma outra forma utilizada para caracterizar o comportamento de secagem da enzima lipolítica foi através de curvas de taxa de secagem em função da umidade do material. Os valores de taxa de secagem foram obtidos por derivação numérica utilizando o software Origin®8.0.

A viabilidade da secagem das enzimas lipolíticas foi avaliada através do efeito imediato do processo sobre a atividade lipolítica, a qual foi determinada de acordo com a metodologia apresentada no item 4.3.3.

Para a determinação da atividade lipolítica uma alíquota da amostra foi retirada a cada hora do processo de secagem.

4.3. METODOLOGIA ANALÍTICA

As análises do substrato fermentado foram conduzidas retirando-se 8 mL da amostra, centrifugando-as a 3000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação do pH, da dosagem de amido, dosagem de proteína e da dosagem da atividade lipolítica.

4.3.1. Concentração de Proteínas

O teor de proteínas totais foi determinado pelo método colorimétrico de LOWRY (1951), utilizando albumina bovina como padrão e leitura a 750 nm.

4.3.2. Concentração de Amido

O teor do amido foi dosado utilizando o método colorimétrico de SOCCOL . Amido foi utilizado como padrão e a densidade ótica é lida a 620 nm. Para a obtenção da curva de calibração é utilizado amido.

4.3.3. Atividade lipolítica

Foi determinada pelo método descrito por SOARES *et al.* (1999). O substrato é composto de óleo de oliva emulsionado com água destilada e goma arábica (7%) na proporção de 50:50. A reação enzimática é formada por 5mL de substrato, 2mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) e 1mL de solução enzimática. A temperatura da reação foi mantida a 30°C em banho termostático por 5 min sob agitação constante (82 rpm). A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de uma solução de acetona, etanol e água (1:1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução padronizada de KOH 0,04 N, utilizando fenolftaleína como indicador.

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera em 1µmol de ácido graxo por min de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em (1U/mL=1µmoles/mL.min). Equação (4.1).

$$\text{Atividade lipolítica (U/mL)} = \frac{(V_a - V_b) \times N \times 1000}{t \times V_c} \quad (4.1)$$

onde: AE é a atividade lipolítica (U/mL); V_a é o volume da amostra titulada (mL); V_b é o volume do branco titulado (mL); V_c é o volume da amostra utilizada na reação (mL); N é a normalidade da solução de KOH, e t é o Tempo de reação em minutos.

4.3.4. Concentração de massa celular seca (X)

Para a determinação do peso seco foram utilizados os precipitados dispostos nos tubos de ensaios após os 15 minutos de centrifugação. Estes foram secos em estufa a 105° C até peso constante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente capítulo são apresentados e analisados os resultados adquiridos no decorrer do trabalho. Para uma melhor compreensão das atividades desenvolvidas, a Tabela 5.1, guia o leitor sobre a seqüência de apresentação dos resultados e discussões obtidos e a metodologia aplicada.

Tabela 5.1. Apresentação Geral dos Ensaio Realizados

Ensaio Realizados	Resultados e Discussão	Metodologia
INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO ÓLEO DE COCO COMO INDUTOR	5.1	4.3.1; 4.3.2; 4.3.3; 4.3.4; 4.3.5
▪ Influência do pH no estudo de produção de enzimas lipolíticas	5.1.1	4.3.6
ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS ...LIPOLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA	5.2	4.2.2; 4.3.1; 4.3.2; 4.3.3; 4.3.4
▪ Avaliação dos efeitos do pH e da temperatura na fermentação submersa	5.2.1	4.3.6
▪ Estudo cinético dos componentes da fermentação submersa	5.2.1.1	4.3.1; 4.3.2; 4.3.3; 4.3.4
▪ Perfil do pH e da Temperatura	5.2.1.2	4.3.6
▪ Efeito do pH e da Temperatura na produção de enzimas lipolíticas por meio de planejamento de experimentos	5.2.1.3	4.3.6
ESTUDO COMPARATIVO DE AVALIAÇÃO DOS ADITIVOS TRITON X-100; TWEEN 80 E PEG	5.3	4.3.7
▪ Produção de Biomassa	5.3.1	4.3.4
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DOS ADITIVOS TRITON X-100 E TWEEN 80 NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS	5.4	4.3.8
▪ Estudo cinético dos componentes da fermentação submersa com aditivos	5.4.1	4.2.2; 4.3; 4.3.1; 4.3.2; 4.3.3; 4.3.4
▪ Efeito da concentração dos aditivos Tween 80 e Triton X-100 na produção de Enzimas lipolíticas por meio do planejamento de experimentos	5.4.2	4.3.8
PRÉ - PURIFICAÇÃO	5.5	4.2.2; 4.3.1; 4.3.3; 4.3.4; 4.3.9
SECAGEM	5.6	4.2.2; 4.3.1; 4.3.3; 4.3.4; 4.3.10

5.1. Influência da Concentração do Óleo de Coco como Indutor

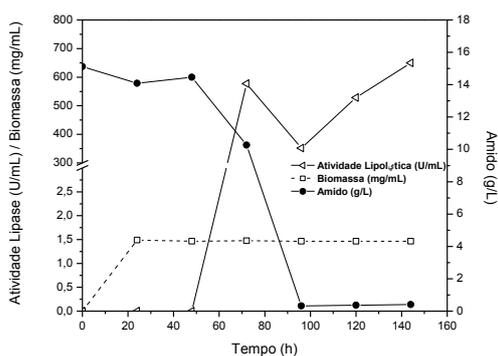
Observa-se que para todas as concentrações de óleo de coco como indutor as atividades enzimáticas permaneceram praticamente constante após a adição do óleo. A massa celular seca foi timidamente formada com concentração de 1% de indutor, com 2% só é observada uma fase exponencial de crescimento microbiano e com 3 verifica-se que a fase exponencial prolonga-se até 80h e a fase de morte microbiana é registrada a partir de 100h. Com a utilização de 4% apenas é observada uma fase estacionária, porém tímida como a do experimento com 2% de indutor. A concentração de amido diminui vertiginosamente nas primeiras 28h, a partir desse ponto o microrganismo passa a ter contato com o óleo e possivelmente a produzir enzimas lipolíticas para poder quebrá-lo em resíduos menores e assim consumi-lo como fonte de carbono.

Pode-se observar, por meio da Figura 5.1, utilizando 1% de indutor (v/v) à 30°C e pH 5,0, que a atividade lipolítica máxima foi de 577 U/mL em 72 horas de fermentação, apresentando após esse período um declínio da sua produção. Demonstrando com esse resultado, valor superior ao de alguns autores como YANG *et al.* (2005), que utilizando *Rhizopus arrhizus* para a produção de lipase por fermentação submersa observou que em 96 horas de fermentação à 26,58°C, pH 7,18 e concentração de óleo de amendoim a 1%, obtiveram um valor máximo de atividade lipolítica de 315 U/mL. KANWAR *et al.* (2002), estudando a produção de lipase por *Pseudomonas* num substrato de n-alcano, obtiveram uma atividade lipolítica de 4,5 U/mL, utilizando 1% (v/v) de óleo de coco produzindo uma biomassa de 1,6 g/L, esta em comparação ao presente estudo mostrou-se superior já que a biomassa máxima obtida a 1% de indutor foi de 1,48 mg/mL.

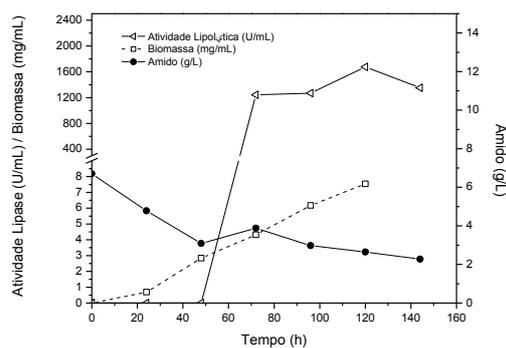
Na curva de crescimento microbiano representada na Figura 5.1, observa-se que nas primeiras 24 horas de fermentação houve o crescimento microbiano de forma exponencial, após esse período até a fase final da fermentação pode-se notar a fase estacionária. Enquanto que a concentração do amido nas primeiras 48 horas de fermentação mostrou-se elevada com aproximadamente 15 g/L, apresentando uma queda após esse período, principalmente depois da inserção do indutor óleo de coco. Demonstrando que a produtividade enzimática está provavelmente associada com o consumo do substrato e não com o crescimento microbiano (BORZANI *et al.*, 2005).

No entanto, nas mesmas condições de fermentação variando somente a concentração de 1 para 2% (v/v) do indutor verificou-se que a atividade lipolítica máxima alcançada foi de 1675 U/mL em 120 horas de fermentação (FIGURA 5.2). GULATI *et al.* (2005) estudaram a produção de lipase por *Fusarium globulosum* em Fermentação Submersa, na qual a maior produção de enzima foi de 3,85 U/mL, à 30°C e pH 6.2, na concentração de óleo de palma a 2%.

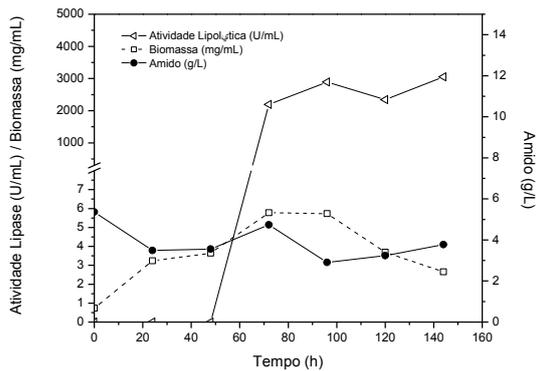
No perfil da curva de crescimento microbiano nota-se nas primeiras 24 horas a existência da fase lag ou de latência, que segundo BORZANI *et al.* (2005), trata-se de um período de adaptação, para em seguida entrar no período de transição. Após a inserção do indutor a curva entra na fase exponencial (log) até às 120 horas de fermentação, na qual alcança uma produtividade máxima de 7,537 mg/mL. A curva da dosagem de amido apresenta no início da fermentação uma concentração elevada de 6,69 g/L que vai declinando até o período de 48 horas, sendo que logo após a inserção do indutor ocorre a elevação da concentração de amido, demonstrando a adaptação do microrganismo ao indutor oleoso. Após este período, houve um declínio da concentração de amido até a fase final da fermentação. Portanto, com base nos resultados obtidos, deve-se considerar que a produtividade enzimática, possivelmente depende da concentração microbiana e do consumo do substrato, o amido e o óleo de coco.



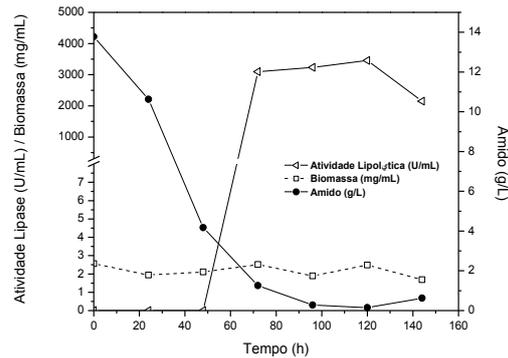
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 5.1. Perfil da atividade lipolítica, da biomassa e do amido, utilizando o óleo de coco como indutor a 1% (a), 2% (b), 3% (c) e (4%).

Na Figura 5.3 observou-se que a adição de 3% (v/v) do indutor óleo de coco apresentou uma atividade lipolítica máxima no valor de 3051 U/mL em 96 horas de fermentação. Resultado superior ao encontrado por TAN *et al.* (2003), em seu estudo utilizando *Candida sp.* em fermentação submersa, com condições similares ao presente trabalho, tendo como fonte de carbono o óleo de palma com concentração de 2,5%, temperatura de 30°C, pH 5,0 em 96 horas de fermentação, chegando a uma produção de 2200 U/mL.

Na curva da dosagem de amido pode-se observar que há um decréscimo da concentração no período em que é inserido o indutor óleo de coco, chegando à conclusão que o microrganismo consumiu uma maior quantidade de amido quando estava em processo de adaptação ao indutor, sendo que logo após esse período o microrganismo adquiriu uma maior afinidade com o indutor oleoso, elevando com isso à concentração da biomassa, esta que no período de 24 horas até as 72 horas apresentou a fase log, passando logo após a inserção do indutor para a fase estacionária (entre 72 e 96 horas de fermentação), alcançando neste ponto a máxima concentração microbiana de 5,77 mg/mL em 96 horas de fermentação, juntamente com a máxima atividade lipolítica alcançada. Podendo chegar à conclusão através dos resultados discutidos, que o crescimento celular e o consumo do substrato, tanto o óleo de coco quanto o amido estão associados possivelmente a produtividade enzimática

Dentre as concentrações testadas (1 a 4%), a atividade lipolítica máxima obtida foi de 3455 U/mL em 120 horas de fermentação utilizando o indutor a 4% (v/v) de

concentração, de acordo com a Figura 5.4. Ao contrário do Biopetro 4 que quanto maior a inserção do indutor óleo de coco maior a produção de enzimas lipolíticas, autores como MAHADIK *et al.* (2004), consideraram a concentração de 1% de indutor azeite de oliva como alta para a produção de lipases ácidas pelo microrganismo mutante de *Aspergillus niger* NCIM 1207 em fermentação submersa nas seguintes condições: pH 5,5, à 30°C e agitação que variou entre 150 e 180 rpm. De acordo com os autores o aumento da quantidade de indutor no meio de cultura não é associado à produção de lipase a partir do microrganismo mutante de *Aspergillus Níger*, nos quais testaram concentrações variadas de indutor (1,0%, 2,5% e 5,0%) e obtiveram como resultado as atividades lipolíticas de 25,6 U/mL, 25,6 U/mL e 25,8U/mL, respectivamente.

No perfil da curva de crescimento microbiano, observa-se praticamente a fase estacionária do início ao final da fermentação, chegando ao ápice do crescimento celular nas primeiras horas de fermentação com uma concentração de 2,56 mg/mL. No caso da curva da dosagem do amido, apresenta-se inicialmente elevada com uma concentração de 13,77 g/L, entrando em declínio no decorrer da fermentação, chegando a 0,62 g/L, o qual pode ser explicado devido a adaptação do microrganismo tanto ao indutor oleoso quanto ao substrato (amido). Demonstrando com isso que a produtividade enzimática, neste caso, está associada possivelmente ao consumo do substrato.

O estudo utilizando diferentes concentrações de óleo de coco mostra que a especificidade das enzimas lipolíticas afeta a composição dos produtos da hidrólise de lipídeos (ácidos graxos, mono e diacilgliceróis) e provavelmente o perfil do crescimento microbiano.

A fermentação submersa mostrou ser um processo bastante eficaz para a produção de enzimas lipolíticas e, neste estudo (TABELA 5.2), promoveu resultados superiores a literatura (KANWAR *et al.*, 2002; MAHADIK *et al.*, 2004; GULATI *et al.*, 2005; WARD & SINGH, 2005)

Tabela 5.2: Concentrações e seus respectivos valores máximos.

Concentração de Óleo	Atividade Enzimática Máxima (U/mL)	Massa Celular Seca (mg/mL)	Tempo (h)
1%	650	1,48	144
2%	1675	7,53	120
3%	3051	5,73	144
4%	3455	2,55	120

A produção das enzimas lipolíticas foi analisada concomitantemente com o perfil do pH. Os resultados estão representados na Tabela 5.3, na qual se pode observar o aumento do pH durante as fermentações para todas as concentrações de indutor. PASTORE (2003) verificou maior estabilidade para a produção da lipase *Rhizopus sp.* na faixa de 5 a 8, similarmente ao observado nesse estudo. A literatura reporta que pH neutro é geralmente definido como ótimo para atividade lipolítica como pode ser verificado nos trabalhos de TAN *et al.* (2003), ABBAS *et al.* (2002), BURKERT (2003), KAMINI *et al.* (1998) e FADILOGLU *et al.* (1997).

Tabela 5.3. Perfil do pH com as concentrações de 1%, 2%, 3% e 4% de óleo de coco como indutor, com temperatura de 30°C e pH 5,0.

Tempo (h)	pH			
	1% (pH=5,0 e T=30°C)	2% (pH=5,0 e T=30°C)	3% (pH=5,0 e T=30°C)	4% (pH=5,0 e T=30°C)
0	5,3	7,0	5,0	5,0
24	5,4	5,0	5,8	5,8
48	8,2	5,0	5,9	5,7
72	8,5	5,0	6,0	5,7
96	8,6	5,0	6,0	5,6
120	8,6	5,1	5,9	5,9
144	8,4	7,0	5,8	5,8

5.2. Influência do pH e da temperatura

Neste ítem são apresentados e discutidos os resultados provenientes da avaliação dos efeitos do pH e da temperatura na fermentação submersa para produção de lípase por meio de planejamento fatorial (Tabela 5.4). Foi utilizado um planejamento fatorial completo com pontos axiais para verificação dos efeitos, onde para uma melhor compreensão, serão apresentados anteriormente, o estudo cinético dos componentes da fermentação: concentração da biomassa, determinação da atividade lipolítica e a dosagem de amido (item 5.2.1.1). E ainda, os perfis de pH e temperatura no item 5.2.1.2.

Tabela 5.4. Resultado do planejamento de experimentos para averiguação do efeito do pH e temperatura na produção de enzimas lipolíticas

Ensaio	Níveis Codificados das Variáveis		Valores Reais das Variáveis		
	X ₁	X ₂	pH	T (°C)	AE (U/mL)
1	-1	-1	3,0	24	3891
2	+1	-1	7,0	24	3749
3	-1	+1	3,0	37	2453
4	+1	+1	7,0	37	4617
5	0	0	5,0	30	3958
6	0	0	5,0	30	4161
7	0	0	5,0	30	4012

5.2.1. Estudo cinético da fermentação submersa

Na Figura 5.6 são apresentados os perfis cinéticos de produção de lípase na temperatura de 24°C.

Observa-se a alta produção de atividade enzimática e a manutenção desta durante após a adição do indutor, no experimento a pH 3,0 (ensaio 1) a máxima atividade 3891 U/mL foi atingida a 96 h de fermentação, já em pH 7,0 o maior valor foi observado (3749 U/mL) em 24h. Sendo os resultados alcançados, superiores aos encontrado por

alguns autores como TAN *et al.*(2003), que estudando a produção de lipase por *Candida sp.* em fermentação submersa, observou que utilizando o óleo de soja como indutor a 2,5%, a uma temperatura de 30°C, pH 3,0 e mesmo tempo de fermentação, obtiveram uma atividade lipolítica de 300 U/mL.

Os resultados do crescimento microbiano para pH 3,0 revelam um período de ascensão no início da fermentação, fase exponencial, chegando ao valor máximo de 5,07 mg/mL, havendo logo após a inserção do indutor um declínio, provavelmente ocasionado pela não adaptação do microrganismo a esta nova fonte de carbono. Verifica-se que a máxima atividade lipolítica alcançada apresenta-se logo após a concentração de massa celular seca entrar em fase de morte, o que pode ser explicado de acordo com TUMANG (2006) e BORZANI *et al.* (2005), pelo mecanismo de produção da biomassa e enzima. No início da fermentação predominam transformações produtoras de energia com formação de biomassa, a enzima só é formada quando o metabolismo oxidativo encontra-se atenuado. Em pH 7,0, a curva de crescimento microbiano permaneceu praticamente na fase estacionária do início até as 72 horas de fermentação, onde atingiu a concentração máxima de 2,24 mg/mL, apresentando logo após esse período o fenômeno de diauxia, este fato promoveu uma segunda fase exponencial e estacionária, caracterizando o metabolismo do segundo substrato, isto é o indutor oleoso.

O consumo de amido na fermentação a pH 3,0 foi lento em comparação com o consumo desta fonte de carbono em pH 7,0. Estes resultados sugerem que a produção de enzimas lipolíticas não está associada a concentração microbiana no meio, porém a presença e capacidade de utilização do indutor como fonte de carbono.

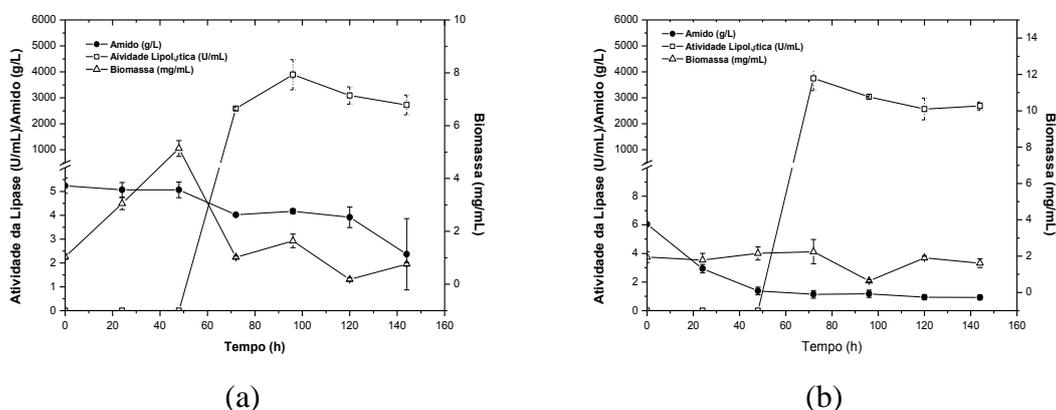
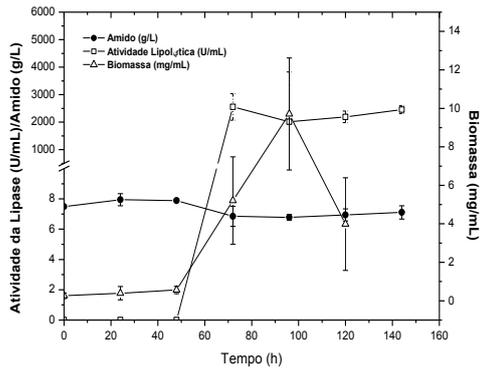


Figura 5.2. Resultados da fermentação para produção de enzima lipolítica a temperatura de 24°C e pH 3,0 (a) e 7,0 (b).

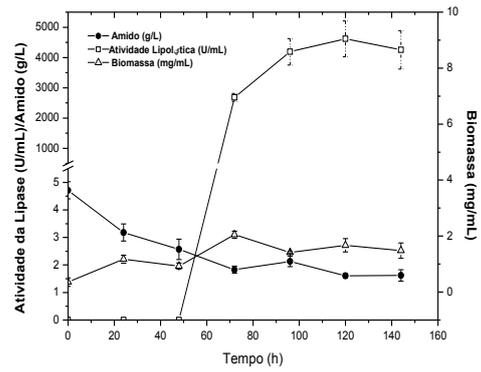
Os resultados das fermentações ocorrendo a temperatura de 37°C e pH 3,0 (ensaio 3) e 7,0 (ensaio 4) são apresentados na Figura 5.8. O valor máximo da atividade lipolítica, 2453 U/mL foi observado a 72 horas de fermentação em pH 3,0 e de 4617 U/mL a 120 h. BURKERT (2003), em condições similares de pH e temperatura, no seu estudo para a otimização das condições de produção da lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552, testando diferentes faixas de temperaturas (27° à 50°C) e pH (2,0 à 9,0), chegou a conclusão que temperaturas de 37°C e pH 7,0 apresentaram melhores resultados, obtendo uma atividade de 26,4 U/mL. Enquanto GULATI *et al.* (2005), utilizando uma lipase de *Fusarium globulosum* em fermentação submersa à 37°C, pH 10,0 e óleo de neem como indutor, obtiveram uma atividade lipolítica de 4,01 U/mL. Já KANWAR *et al.* (2002), apresentaram uma atividade lipolítica de 25 U/mL, utilizando como fonte de enzimas lipolíticas, em fermentação submersa à 34°C e pH 8,0, as bactérias *Pseudomonas G6*, isoladas de solo contaminado com petróleo.

O crescimento microbiano foi mais pronunciado em pH 3,0 (10,93 mg/mL a 96 h) quando comparado com a fermentação em pH 7,0 (2,05 mg/mL a 72 h); esta observação também foi verificada quando a fermentação foi conduzida a 24°C. Segundo GINALSKA *et al.* (2007), no seu estudo do efeito das condições de cultura no crescimento e produção de lipase, atestaram que o crescimento microbiano é afetado principalmente pela temperatura e pelo tempo de incubação, onde foram testadas temperaturas de 30 a 40° e o período de incubação foi de seis dias, resultando numa produtividade máxima (atividade lipolítica: 150 U/mL e massa celular seca: 1.04 g/l,) em dois dias de fermentação à 30°C,.

Na curva da dosagem de amido nota-se que o maior consumo do amido ocorre na fermentação a pH 7,0 e rapidamente até a adição do indutor (46%) e chega a quase a 59% do valor inicial, denotando que após a adição do indutor a bactéria Biopetro 4 passa que produzir enzima para consumir o óleo como fonte de carbono.



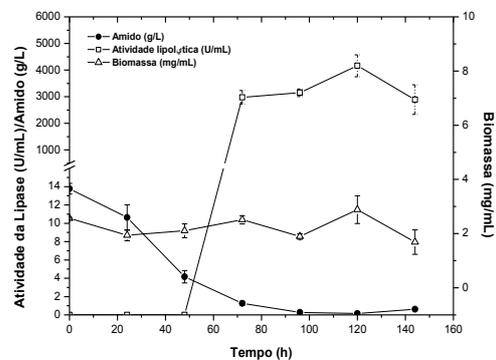
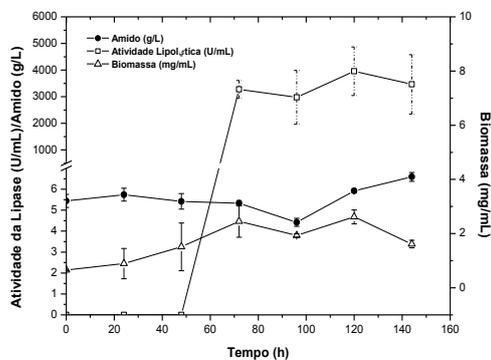
(a)



(b)

Figura 5.3. Resultados da fermentação para produção de enzima lipolítica a temperatura de 37°C e pH 3,0 (a) e 7,0 (b).

Na Figura 5.10 observa-se os resultados da fermentação para a produção de lipase à 30°C e pH 5,0, correspondendo aos pontos centrais do planejamento de experimentos. A atividade lipolítica máxima alcançada foi em 120 horas de fermentação com os valores de 3958 U/mL, 4161 U/mL e 4012 U/mL, em média 4043,7 U/mL. Este valor é maior que os encontrados por MAIA *et al.* (2001), no seu estudo para determinar o efeito das condições de cultivo para a produção de lipase por *Fusarium solani* em fermentação submersa, à 28°C e pH 5,5, onde a atividade lipolítica máxima alcançada foi 0,371 U/mL em 120 de horas de fermentação, utilizando como indutor o óleo de palma de babassu. E os encontrado por BURKERT (2003), que utilizando uma lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y552 em fermentação submersa atingiram uma atividade lipolítica de 15,57 U/mL em 48 horas de fermentação, à 30° C e pH 7,0.



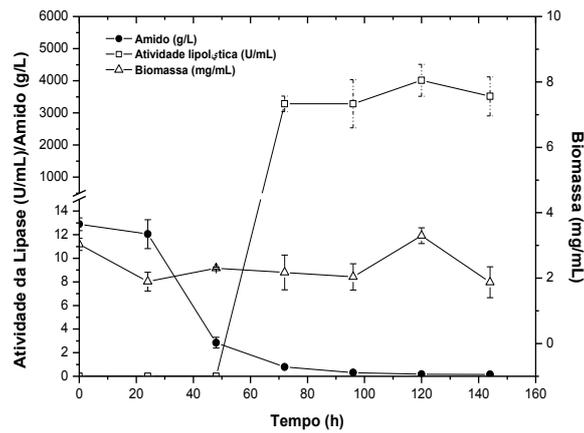


Figura 5.4. Resultados da fermentação para produção de enzima lipolítica a temperatura de 30oC e pH 5,0.

A curva de crescimento microbiano mostra que há um estado estacionário nas fermentações com máxima produção de massa celular seca de 2,16 mg/mL, 2,88 mg/mL e 3,3 mg/mL sendo todas conseguidas a 120 h de fermentação. O consumo de amido foi elevado e em duas fermentações este consumo foi quase que completo.

A variação do pH em todos os ensaios são apresentados na Figura 5.11, observa-se que não há grandes variações entre os valores iniciais e finais.

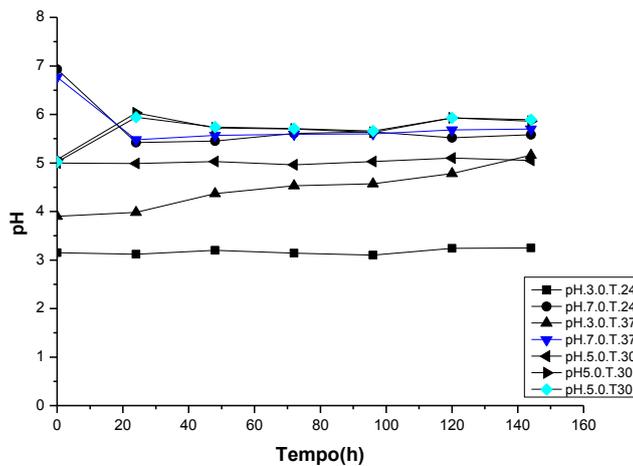


Figura 5.5. Perfil do pH com relação ao tempo.

5.2.2. Resultados do planejamento de experimentos

Tabela 5.5. Estimativas de Efeito calculadas no estudo de avaliação da temperatura e pH ótimos para a produção de enzimas lipolíticas.

Variável Independente	Estimativa de Efeito	Erro padrão	p
Média Global	4087,23	± 57,80	0,0002*
X ₁ : pH (L)	994,00	± 76,46	0,005866*
pH (Q)	- 801,85	± 138,60	0,028604*
X ₂ : Temperatura	- 301,43	± 76,46	0,058739
X ₁ X ₂	1169,60	± 76,46	0,004247*

$$R^2 = 0,99$$

(L)¹= Modelo Linear

(Q)²= Modelo Quadrático

A validade do planejamento também foi verificada pelos resultados apresentados na Tabela 5.6 da análise de variância (ANOVA), por meio da qual se observou que o pH e a interação da temperatura com o pH apresentaram influência significativa ao nível de 95% de confiança, já que os valores de p são menores que 0,05. No entanto a temperatura não apresentou influência significativa.

Tabela 5.6. Análise de variância para o estudo de avaliação da temperatura e pH para a produção de enzimas lipolíticas.

Efeitos	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	p**
X ₁ : pH (L)	1129201,0	1	1129201,0	0,0058*
pH (Q)	223644,0	1	223644,0	0,028*
X ₂ : T	103842,0	1	103842,0	0,058
X ₁ X ₂	1563394,0	1	1563394,0	0,004*
Erro total	13365,0	2	6682,0	

Total (corrigido) = 2683999,0

R² = 0,99

**p: Teste estatístico para estimativa do intervalo de confiança do modelo.

A superfície de resposta e a curva de nível são apresentadas na Figura 5.12, elas apresentam a relação entre os efeitos estudados. De acordo com a superfície de resposta, pode-se afirmar que a região otimizada para atividade lipolítica encontra-se numa faixa entre pH 5,0 e 7,0 e temperaturas na faixa entre 30°C e 37°C, obtendo-se uma atividade lipolítica máxima de 4617 U/mL à 37°C e pH 7,0 (Tabela 5.3). O modelo estatístico determinado para a resposta estudada foi obtido considerando os coeficientes significativos a $p < 0,05$ para o modelo com as variáveis codificadas, sendo expresso pela equação (5.1):

$$Y = 4087,23 + 497,00 X_1 - 400,93 X_1^2 + 584,80 X_1 X_2 \quad (5.1)$$

onde X_1 e X_2 representam os valores codificados para a pH e temperatura, respectivamente.

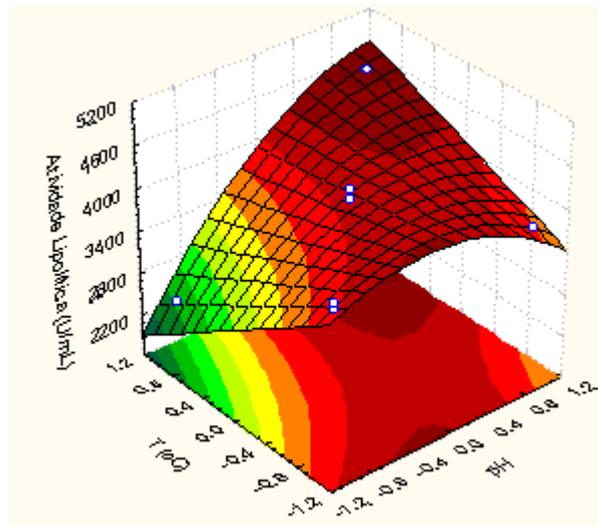


Figura 5.6. Superfície de Resposta para o estudo de avaliação da temperatura e pH ótimos para a produção de enzimas lipolíticas.

A partir da análise dos resultados obtidos, observou-se que dentre os parâmetros reacionais testados, o pH (7,0) foi o fator que demonstrou maior efeito na variável resposta (atividade lipolítica), bem como a interação entre o pH e a temperatura. No entanto somente a temperatura não apresentou influência significativa na produção das enzimas lipolíticas. Resultados semelhantes foram encontrados por KADER *et al.* (2007) no estudo da otimização da produção de lipase por *Rhizopus* MR 12 em fermentação submersa, chegaram a conclusão que o pH na faixa entre 6,0-7,0 produzia a máxima atividade enzimática. PINHEIRO (2006), no seu estudo para a produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo, determinou através do planejamento de experimentos que pH 7,0 promoveu uma maior atividade lipolítica.

GINALSKA *et al.* (2007) notaram que as condições ótimas para a produção de enzimas lipolíticas por *Geotrichum*-like R59 em fermentação submersa era temperatura de 30°C e pH 6,0. Em seu outro estudo do efeito das condições de cultivo para o crescimento e produção celular por *Geotrichum*-like R59 em fermentação submersa GINALSKA (2007) reporta que a faixa de pH entre 3,0 e 9,5 favoreceram o crescimento celular. No entanto a produção caiu drasticamente quando o pH utilizado foi 9,5, não obtendo nenhuma atividade com pH acima desse valor. Enquanto PINHEIRO (2006), no seu estudo para a produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo, afirma que temperaturas na faixa de 29°C e 45°C e valores de pH entre 7,0 e 8,5 representam as condições ótimas de atividade lipolítica. No entanto BURKERT (2003), demonstra que temperatura de 37°C e pH 7,0 foram definidas como ótimas para a produção de enzimas lipolíticas por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552, no seu estudo para a otimização da produção de lípases.

Com o objetivo de estudar o efeito do pH sobre a produção de lípases, GULATI *et al.* (2005), variaram o pH do meio na faixa entre 3,0-10,0, onde os resultados adquiridos demonstraram que a máxima atividade lipolítica foi produzida em pH 7,0, embora o microrganismo fosse capaz de crescer nas outras faixas de pH.

Após a realização de uma análise estatística e do estudo cinético dos componentes da fermentação submersa, através da qual foi detectada a região otimizada para a produção máxima de enzimas lipolíticas será apresentado no seguinte capítulo o estudo

comparativo de avaliação dos aditivos Triton X-100, Tween 80 e PEG. Sendo este realizado, com o intuito de aumentar a produção de enzimas lipolíticas.

5.3. Influência da Adição de Surfactantes no meio de cultura

5.3.1. Perfil cinético da produção de lípase na presença de surfactantes

O estudo da adição de PEG 1500, Triton X-100 e Tween 80 foi realizado com o intuito de otimizar o processo de produção de enzimas lipolíticas. Em todo o estudo foi utilizado o mesmo meio de cultura, com o acréscimo de 1% do aditivo, contendo 4% de indutor óleo de coco acrescido após 48 horas de fermentação com uma rotação de 170 rpm, na temperatura de 37°C e pH 7,0. Os resultados são mostrados na Figura 5.17. e Tabela 5.7.

Observa-se que há uma tendência a manutenção da atividade lipolítica após 72h de fermentação para o experimento contendo Triton X-100 e discreta redução para as fermentações com Tween 80 e PEG.

Observa-se que Triton X-100 foi o aditivo que apresentou a máxima atividade lipolítica com 7185 U/mL em 120 horas de fermentação. Comparativamente às fermentações sem surfactantes, os valores da atividade enzimática foram 56% e 49% maior para Triton X e Tween 80, respectivamente, ao passo que a adição de PEG não possibilita um incremento na atividade da enzima. ZHANG *et al.* (2003), no seu estudo dos efeitos dos indutores na produção de lípase por *Candida rugosa*, utilizando o Tween 85 obtiveram uma produção 70,8% maior que sem aditivo.

A massa celular seca aumentou com o tempo de fermentação. Em todos os experimentos foi verificada uma fase estacionária de crescimento celular até o final da fermentação, mesmo com Triton X-100, o elevado desvio na determinação da massa celular seca não permite avaliar como oscilação o fenômeno de diauxia. BORZANI *et al.* (2005) e TUMANG (2006), verificaram que quando a máxima atividade lipolítica ocorre logo após a fase de morte celular, é devido a predominância de transformações da geração de energia para o microrganismo e conseqüentemente geração de massa microbiana, sendo a enzima produzida na fase de morte quando o metabolismo oxidativo encontra-se atenuado, porém este fenômeno não foi observado neste estudo. As adições dos surfactantes na fermentação também proporcionaram o aumento da massa celular seca, com exceção da adição de PEG, que promoveu a redução da

concentração microbiana. ZHANG *et al.* (2003), no seu estudo do efeito de indutores para a produção de lipase por *Candida rugosa*, encontrou valores inferiores aos encontrado no presente estudo que foi de: 3,5 g/L⁻¹ para o Triton X-100 e 3,6 g/L⁻¹ para o Tween 80.

A concentração de amido diminuiu com o tempo de fermentação, sendo mais pronunciado na fermentação com Tween 80. Os valores encontrados para Triton X-100 aumentado ao final da fermentação é atribuído a alguma interferência ocorrida, promovida por metabolitos durante o final da fermentação.

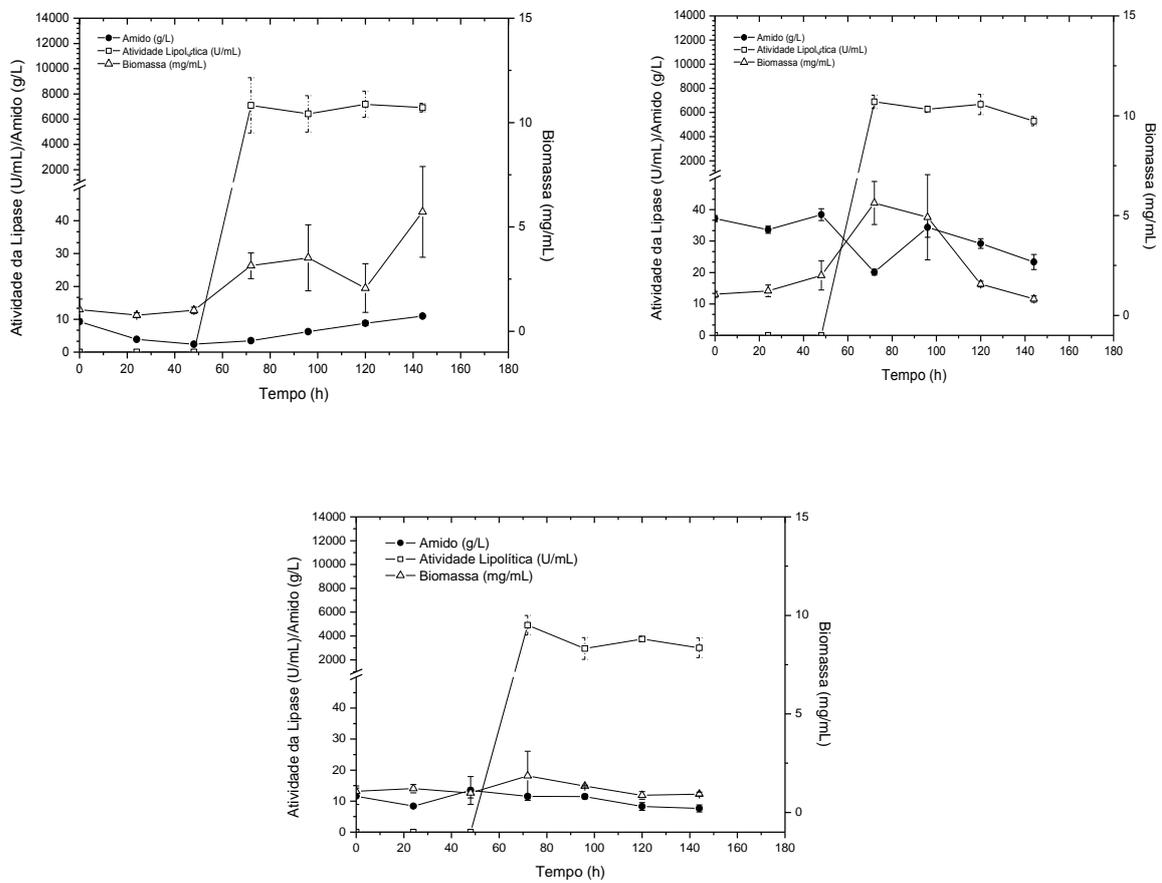


Figura 5.7. Resultados da fermentação para obtenção de lipase em presença de 1% de Triton X (a), Tween 80 (b) e PEG (c).

Tabela 5.7. Melhores resultados da fermentação com e sem adição de aditivos para produção de lipase a 37oC e pH 7,0.

Aditivo	Massa Celular Seca	Atividade Enzimática (U/mL)
Nenhum	2,05	4617
Triton X-100	5,72	7185
Tween 80	5,63	6882
PEG	1,85	4906

5.3.2. Resultados do planejamento de experimentos para estudo da influencia de surfactantes na fermentação para produção de lipase.

No presente item serão discutidos e analisados os resultados provenientes da avaliação dos efeitos da concentração dos aditivos Triton X-100 e Tween 80 na fermentação submersa. Os perfis cinéticos dos experimentos do planejamento de experimento são apresentados nas Figuras 5.19, 5.20 e 5.21.

Utilizando uma concentração de 0,2% de Triton X-100, verifica-se que a atividade lipolítica máxima ocorreu em 144 horas de fermentação com o valor de 4697 U/mL. Enquanto LIN (1996), no seu estudo para a produção por fermentação submersa de lipase alcalina de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111, em meio de cultura contendo 0,2% de Triton X-100 como aditivo e 0,2% de óleo de oliva como indutor à 30°C, obtiveram uma atividade máxima de 56 U/mL em 24 horas de fermentação. Em seu outro estudo LIN *et al.* (1995), observou os efeitos do Triton X-100 para a produção de lipase alcalina por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111 em fermentação submersa, testando diferentes concentrações do aditivo Triton X-100, chegando a conclusão que com a adição de pequenas quantidades, a atividade lipolítica aumenta significativamente, atingindo a máxima atividade lipolítica de 95 U/mL, com a concentração de 0,2% do aditivo.

Utilizando 0,2% de Tween 80, a atividade lipolítica máxima foi de 3982,17 U/mL em 144 horas de fermentação. No entanto LI *et al.* (2001), apresentou valor inferior no seu estudo para a produção por fermentação submersa de lipase por *Acinetobacter radioresistens* utilizando 0,3% de Tween 80 como fonte de carbono, obtiveram uma

atividade lipolítica máxima de 25 U/mL em 6 horas de fermentação. O autor fez a comparação utilizando uma fermentação sem aditivos, com azeite de oliva como fonte de carbono, e chegaram a um valor de 2,5 U/mL. Reforçando a tese de que a presença de aditivos no meio de cultura aumenta a atividade enzimática. De acordo com DALMAU *et al.* (2000), além do Tween 80 estimular a biosíntese da lipase ele aumenta a permeabilidade celular (principalmente de leveduras), facilitando assim a exportação de diversos compostos em toda a célula através de sua membrana.

Em relação à curva de crescimento microbiano pode ser observada a existência de apenas uma fase estacionária ao longo de todo o período da fermentação, variando o mínimo da concentração microbiana na fermentação com 0,2% de Triton X e 0,2% de Tween 80. As máximas concentrações de massa celular seca foi de 0,91 mg/mL e 3,0 mg/mL para Triton X-100 e Tween 80 respectivamente.

A curva da dosagem de amido no início da fermentação apresenta-se elevada, mas logo após entra em declínio, permanecendo com a concentração praticamente constante após a inserção do indutor. Neste caso a produtividade enzimática possivelmente dependeu do consumo do indutor óleo de coco e do amido, já que não houve praticamente nenhuma alteração na curva de crescimento microbiano.

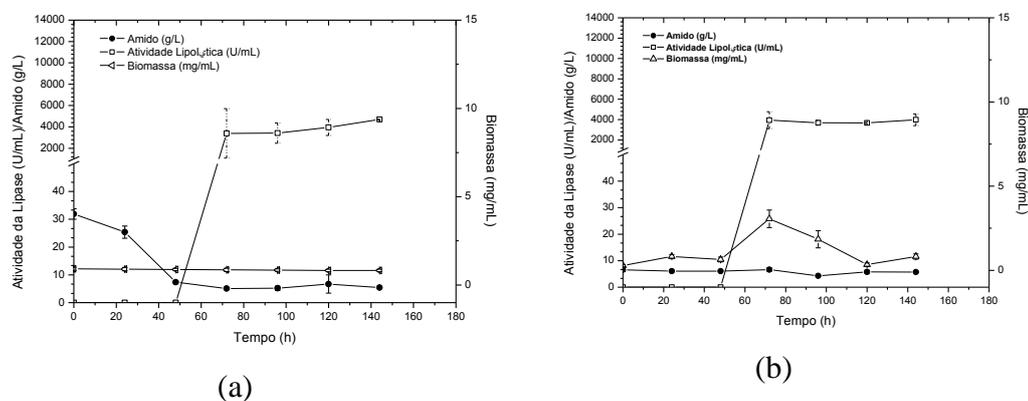


Figura 5.8. Resultados da fermentação para produção de lípase utilizando 0,2% de Triton X-100. (a) e 0,2% de Tween 80. (b)

A Figura 5.20 apresenta os resultados para a fermentação com Triton X-100 (ensaio 3) e Tween 80 (ensaio 4) na concentração de 1%. A máxima produção de enzima lipolítica ocorreu às 120 horas de fermentação com o valor de 7185,92 U/mL para Triton X-100, já para Tween 80 esse valor foi de 6882,78 U/mL à 72 h. BURKERT (2003), testou diferentes meios de cultura para a produção de enzimas

lipolíticas em fermentação submersa, dentre eles 0,7% de Tween 80, 1% de óleo de soja como indutor à 37°C e pH 7,0, alcançando uma atividade lipolítica aproximadamente de 11 U/mL. Segundo o autor a presença do aditivo Tween 80 praticamente não influenciou na produtividade enzimática, já que na ausência do aditivo a atividade lipolítica alcançada foi semelhante à de com aditivo. Enquanto CORZO *et al.* (1999), no seu estudo para a produção e caracterização da lipase de *Yarrowia lipolytica* 681, utilizaram como fonte de carbono 0,5 mg/mL de Tween 80, à 34°C e pH 6,0, obtendo uma atividade lipolítica de 7,4 U/mL em 48 horas de fermentação, produzindo uma biomassa equivalente a 5,4 g/L. Os pesquisadores também utilizaram nas mesmas condições o óleo de palma como indutor, não havendo detecção de atividade.

A curva da dosagem de amido manteve-se praticamente constante ao longo da fermentação, elevando a concentração após 96 horas de fermentação. Podendo concluir que o alcance da máxima produtividade enzimática possivelmente dependeu do crescimento celular, do consumo do substrato e do indutor óleo de coco.

A curva de crescimento microbiano apresentou fase de adaptação extensa, ocorrendo até 48 e 24 horas para as fermentações com Triton X-100 e Tween 80. Em seguida a curva de crescimento microbiano com Tween 80 apresentou fase exponencial, estacionária e morte. A maior concentração microbiana ocorreu a 72h com Tween 80 e foi igual a 5,63 mg/mL, no mesmo tempo que a atividade lipolítica atingiu o seu máximo.

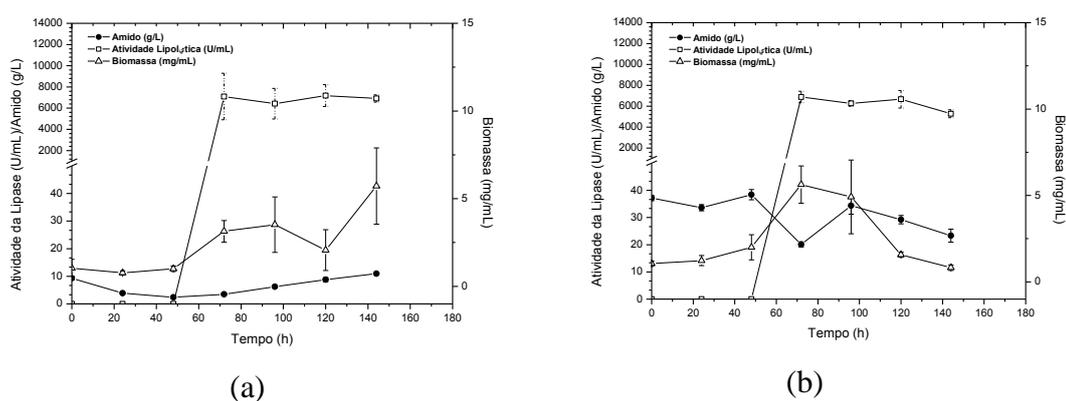
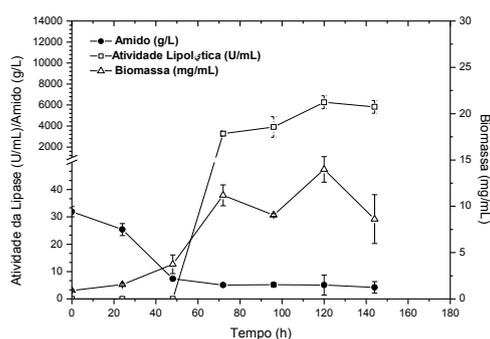


Figura 5.9. Resultados da fermentação para produção de lipase utilizando 0,2% de Triton X-100. (a) e 0,2% de Tween 80. (b).

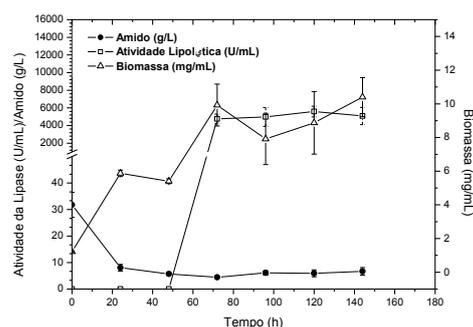
Os resultados no ponto central do planejamento de experimentos podem ser observados nas Figura 5.21, para uma concentração de 0,6% dos aditivos Tween 80 e Triton X-100, através dos quais nota-se uma semelhança entre os perfis da atividade lipolítica, isto é, as curvas da atividade obtiveram a máxima atividade lipolítica em 120 de horas de fermentação com os valores 6266 U/mL, 5592 U/mL, 5544 U/mL e 5698 U/mL respectivamente.

O perfil da curva de dosagem de amido é semelhante para todos os gráficos, isto é, a curva apresenta uma concentração máxima no início da fermentação, sendo que no decorrer desta há o consumo do substrato pelos microrganismos, havendo com isso um decréscimo natural da concentração de amido.

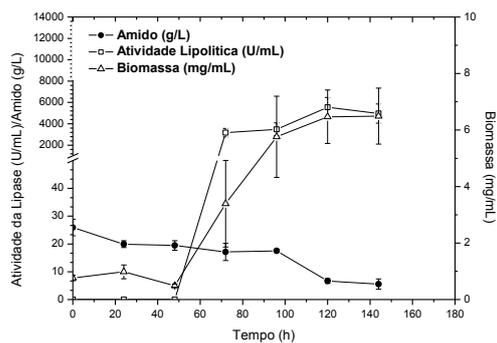
Nas curvas de crescimento microbiano em Triton X-100, pode-se observar a presença da fase lag prolongada (48 h) e estacionária estendendo-se até o final da fermentação. A máxima concentração foi de 13,97 mg/mL e 6,49 mg/mL em 144h de fermentação. Utilizando o Tween 80 verifica-se inicialmente a fase exponencial em 24 e 72h, seguida da fase estacionária. As máximas concentrações de massa celular seca foi de 10,40 mg/mL e 8,86 mg/mL em 144 horas de fermentação. Valores estes superiores aos encontrados por DALMAU *et al.* (2000), que no seu estudo dos efeitos de diferentes fontes de carbono na produção de lipase por *Candida rugosa* em fermentação submersa, utilizaram 2g/L de Tween 80 em pH 6.2 e temperatura 30°C, obtendo uma atividade de 0,4 U/mL com um crescimento celular de 0,75 g/L.



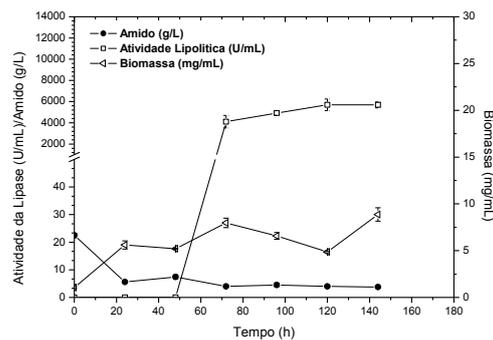
(a)



(b)



(a)



(b)

Figura 5.10. Resultados da fermentação para produção de lipase utilizando 0,6% de de Triton X-100. (a) e de Tween 80. (b)

A Tabela 5.8 apresenta as atividades lipolíticas nos diversos níveis do planejamento de experimentos.

Tabela 5.8. Planejamento de experimentos com diferentes concentrações de aditivos.

Ensaio	Níveis Codificados das Variáveis		Valores Reais das Variáveis		
	X ₁	X ₂	Aditivos	Concentração (%)	Atividade Lipolítica (U/mL)
1	-1	-1	Triton X-100	0,2	4697
2	+1	-1	Tween 80	0,2	3982
3	-1	+1	Triton X-100	1	7185
4	+1	+1	Tween 80	1	6882
5	-1	0	Triton X-100	0,6	6266
6	+1	0	Tween 80	0,6	5592
7	-1	0	Triton X-100	0,6	5544
8	+1	0	Tween 80	0,6	5698

De acordo com o item anterior, chegou-se a conclusão que os aditivos possuidores de uma maior atividade lipolítica foram o Triton X-100 e o Tween 80. Neste caso, os valores qualitativos no planejamento de experimentos foram representados por: (-) Triton X-100 e (+) Tween 80.

Para uma análise mais específica dos dados, foram avaliados os efeitos principais das variáveis estudadas (concentração e tipo de aditivo) e suas interações, Tabela 5.9 e 5.10 e a Figura 5.27.

Analisando a Tabela 5.9, onde estão representados os dados da análise das estimativas de efeito, os erros padrões e o valor de p. Observando os valores de p, nota-se que os aditivos (X_1) e as concentrações (X_2) apresentaram influência significativa. No entanto a interação entre os aditivos e as concentrações (X_1X_2) não apresentou influência significativa ao nível de 90% de confiança. Verifica-se ainda dentro da região analisada que o aditivo (X_1) apresentou um erro padrão de $\pm 63,26$, para a concentração de aditivo (L) o erro padrão foi de $\pm 89,46$, já para concentração de aditivo (Q) o erro padrão foi de $\pm 126,52$.

Tabela 5.9. Estimativas de Efeito calculadas no estudo de avaliação da concentração dos aditivos Tween e Triton X-100.

Variável Independente	Estimativa de Efeito	Erro padrão	P
Média Global	5908,08	$\pm 44,73$	0,000001*
X_1 : Aditivo	- 517,25	$\pm 63,26$	0,0038*
X_2 : Concentração (L)	2694,59	$\pm 89,46$	0,00008*
Concentração (Q)	- 442,05	$\pm 126,52$	0,039*
X_1X_2	206,02	$\pm 89,46$	0,104

$R^2 = 0,99$

(L)¹= Modelo Linear

(Q)²= Modelo Quadrático

A partir da análise de variância (ANOVA), Tabela 5.10, observou-se que o aditivo e a sua concentração foram fatores importantes, pois os valores apresentaram influência significativa ao nível de 90% de confiança, isto é os valores de p são menores que 0,1.

Tabela 5.10. Análise de variância para o estudo de avaliação da concentração dos aditivos Tween e Triton X-100.

Efeitos	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	p**
X ₁ : Aditivo	535111,0	1	535111,0	0,03*
X ₂ : Concentração (L)	7260815,0	1	7260815,0	0,00008*
Concentração (Q)	97706,0	1	97706,0	0,03965*
X ₁ X ₂	42444,0	1	42444,0	0,1047
Erro total	24011,0	3	8004,0	

Total (corrigido) = 7960088,0.

R² = 0,99

P*: Teste estatístico para estimativa do intervalo de confiança do modelo.

Analisando a superfície de resposta, a partir dos resultados obtidos (Figura 5.27), observou-se que a região otimizada para uma máxima produção de enzimas lipolíticas encontrou-se na faixa com as concentrações mais elevadas entre 0,6% e 1% (Tabela 5.8). O modelo estatístico utilizado para a resposta estudada foi obtido considerando os coeficientes significativos a $p < 0,1$ para o modelo com as variáveis codificadas, sendo expresso pela equação (5.2):

$$Y = 5908,08 - 258,5 X_1 + 1477,29 X_2 - 221,02 X_2^2 \quad (5.2)$$

onde X₁ e X₂ representam os valores codificados para o aditivo e concentração, respectivamente.

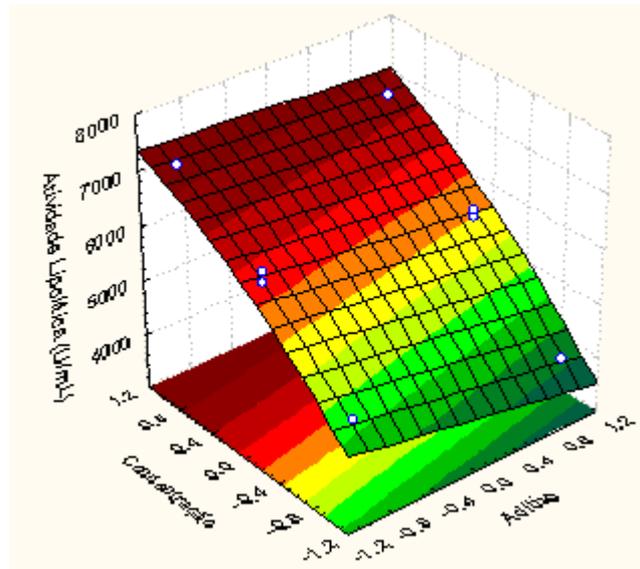


Figura 5.11. Superfície de Resposta para o estudo de avaliação da concentração dos aditivos Tween e Triton X-100.

Observando os resultados obtidos, verifica-se que dentre os parâmetros reacionais testados, a concentração de 1% foi a que demonstrou maior efeito na variável resposta (atividade lipolítica), assim como o tipo do aditivo. Neste caso, os dois aditivos analisados apresentaram resultados similares. Entretanto a interação entre o tipo de aditivo e a concentração não apresentou influência significativa na produção de enzimas lipolíticas.

5.5. Pré-Purificação

Na etapa de pré-purificação realizada após a análise das concentrações dos aditivos Triton X-100 e Tween 80 e seus efeitos na produção de enzimas lipolíticas, no qual se chegou à melhor concentração de 1% foram adicionadas diferentes concentrações de sulfato de amônio, como pode ser observado na Tabela 5.11. Para esta etapa foram utilizados o mesmo meio de cultura descrito no item 4.2.1, contendo 1% de aditivo, 4% de indutor óleo de coco acrescido após 48 horas de fermentação com uma rotação de 170 rpm, pH 7,0 e temperatura de 37°C.

Verifica-se que a atividade enzimática foi maior na fase aquosa que no precipitado, indicando que durante o processo as proteínas contaminantes precipitaram enquanto que as enzimas permaneceram na fase aquosa. Este fato é surpreendente, haja vista que a literatura reporta apenas a precipitação das enzimas, entretanto o presente

resultado é promissor para a aplicação de outros processos de purificação. Com o aumento da concentração de saturação do sulfato de amônia, percebeu-se que ocorre o aumento do fator de purificação, o qual foi maior quando foi utilizado o aditivo Triton X-100 (2,59 vezes).

Estudando a produção, purificação e caracterização de uma lipase extracelular de *Aureobasidium pullulans* HN2.3 com potencial para aplicação na hidrólise de óleos comestíveis, LIU *et al.* (2008), conseguiram obter uma atividade específica de 40,2 U/mg com 80% de sulfato de amônio e um fator de pureza de 1,5 vezes.

KANWAR *et al.* (2002), para a produção e isolamento da lipase de *Pseudomonas* em substrato de n-alcano utilizando a técnica de precipitação por sulfato de amônio, obtiveram uma atividade específica de 19,46 U/mg, com um fator de pureza de 1,41 vezes maior do que no início do processo e um total de proteína de 758 mg, com uma adição de 0,5 % de sulfato de amônio (w/v). Enquanto RAJ *et al.* (2008), estudando a purificação e a caracterização bioquímica de uma metalolipase alcalina extra-celular de *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: utilizaram 70% de sulfato de amônio, obtendo uma atividade específica de 10,7 U/mg com um fator de pureza de 4,26.

Purificando e caracterizando uma lipase termoestável alcalina de *Aspergillus carneus*, SAXENA *et al.* (2003), atingiram uma atividade específica de 54,43 U/mg, com um fator de purificação de 2,41 vezes maior. ABBAS *et al.* (2002), na purificação da lipase de *Mucor sp.*, não adicionaram óleo de palma no meio de cultura, devido a desvantagem da presença de lipídeos durante a purificação enzimática. Segundo os autores, a lipase produzida por *Mucor sp.* é constitutiva e pode ser produzida na ausência de lipídios. Para a purificação da enzima os autores utilizaram 75% de sulfato de amônio obtendo um total de proteínas de 916mg, uma atividade específica de 129 U/mg, com um fator de pureza 20,48 vezes maior que no início do processo. No entanto, no caso do presente estudo, ocorreu que em vez do óleo de palma permanecer na fase aquosa como era de se esperar, o que poderia prejudicar a pré-purificação, precipitou juntamente com as proteínas, formando uma pasta espessa.

Tabela 5.11. Pré – Purificação enzimática do substrato fermentado utilizando Tween 80.

Aditivos								
Tween 80 (Fase Aquosa)					Tween 80 (Fase Precipitada)			
Saturação (%)	Atividade Lipolítica (U/mL)	Proteína (g/L)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Pureza	Atividade Lipolítica (U/mL)	Proteína (g/L)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Pureza
40	91353,8	4,96	18418	1,48	80291,0	8,86	80291	0,72
50	97812,0	5,49	17816	1,43	64595,8	7,43	64595	0,69
60	107244,8	5,34	20083	1,61	74256,8	7,82	74256	0,76
70	134395,0	5,15	26096	2,10	77596,3	5,11	77596	1,22
80	125105,8	4,8	26063	2,09	74066,8	9,97	74066	0,59

Tabela 5.12. Pré – Purificação enzimática do substrato fermentado utilizando Triton X-100.

Aditivos								
Triton X-100 (Fase Aquosa)					Triton X-100 (Fase Precipitada)			
Saturação (%)	Atividade Lipolítica (U/mL)	Proteína (g/L)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Pureza	Atividade Lipolítica (U/mL)	Proteína (g/L)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Pureza
40	100043,5	7,36	13592	2,55	2782,7	24	2782	0,52
50	105529,8	6,23	16938	3,18	2990,1	25,25	2990	0,56
60	108020,0	5,58	19358	3,63	2964,7	26,75	2964	0,55
70	101529,8	5,12	19830	3,72	716,2	19,69	716	0,13
80	106610,9	4,92	21668	4,07	1321,7	2,59	1321	0,24

5.6. Secagem de Enzimas

A partir dos resultados obtidos anteriormente (capítulo 5.5), foi feita a secagem enzimática do material pré-purificado nas seguintes condições de temperatura: 40°, 65° e 80°C, por meio de um aparelho de infravermelho. A medição da temperatura e a pesagem do material foram feitas a cada vinte minutos.

Pode-se observar por meio da FIGURA 5.29, no perfil da umidade com relação ao tempo à 40°C, que a curva no início do processo de secagem foi elevada entrando em seguida num processo de decaimento. Entretanto, apesar da passagem de doze horas no aparelho de infravermelho, o substrato enzimático não completou o processo de secagem.

Enquanto as FIGURAS 5.30 e 5.31, obtiveram uma secagem mais eficiente em um curto espaço de tempo, devido às temperaturas utilizadas, 65° e 80° C na fonte, isto é, o equipamento de infravermelho emitia a temperatura previamente programada. No entanto, a temperatura que chegava a amostra era menor, devido ao calor que se dissipava ao longo da sua emissão.

Na Figura 5.1 são apresentados os resultados típicos de cinética de secagem do material exposto à radiação IV, com temperatura da fonte de 65°C. É possível constatar a proximidade das réplicas, de modo que diferença entre os valores experimentais de umidade são inferiores aos erros de medida. Isto confirma a reprodutibilidade dos dados obtidos e, conseqüentemente, a validade da metodologia experimental empregada.

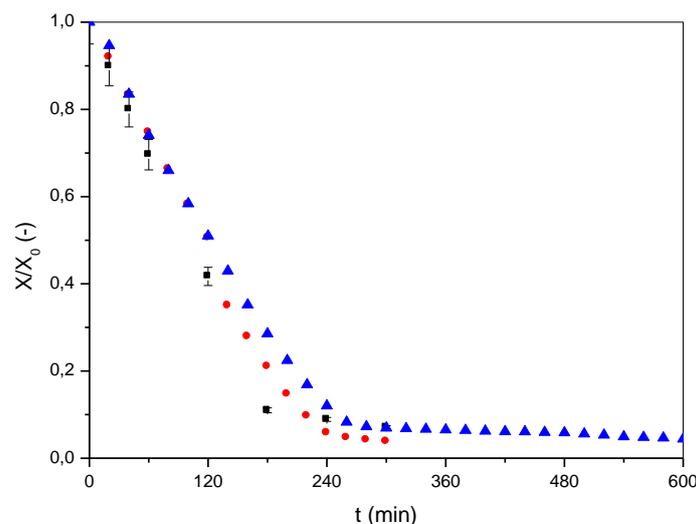


Figura: Teor de umidade adimensional em função do tempo, para temperatura da fonte de 65°C.

A Figura V.4 mostra a taxa de secagem em função do teor de umidade em base seca, parametrizada nas temperaturas atingidas pelo material. Verifica-se que a secagem infravermelho ocorreu nos períodos de taxa constante e decrescente, indicando que tanto as resistências externas como as internas à transferência de massa governam o processo de secagem.

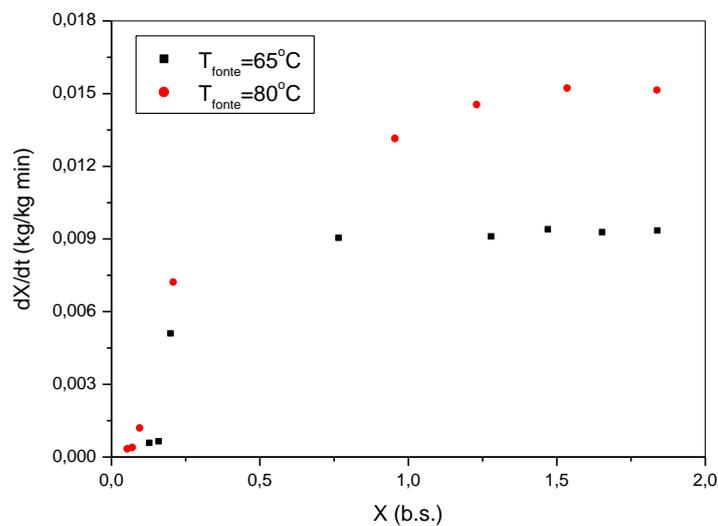


Figura V.4. Taxa de secagem em função do teor de umidade em base seca, para diferentes temperaturas.

No início do processo a migração interna de umidade consegue suprir a taxa de evaporação na superfície, a qual é exposta à radiação eletromagnética, o que resulta no período a taxa constante. Comportamentos similares foram obtidos sob toda a faixa operacional empregada. As taxas de secagem foram maiores no início do processo, diminuindo gradualmente com a remoção de umidade. Isto porque uma maior quantidade de energia radiante é absorvida pela água localizada inicialmente na superfície das partículas, resultando em maiores taxas. Mas com a secagem da

superfície do material, a penetração de calor através da camada seca diminui, reduzindo assim a taxa de secagem.

Observando os resultados apresentados nas FIGURAS 5.36 e 5.37, nota-se que tanto na temperatura de 65°C quanto na de 80°C, a atividade específica inicialmente demonstrou-se baixa e ao longo do tempo de radiação com o infravermelho foi elevando-se, chegando numa atividade específica máxima em seis horas de secagem de 54 U/mg e 58 U/mg respectivamente. Sendo que logo após a esse período houve um decaimento da atividade até o final do processo. Na FIGURA 5.35, à 40°C, observou-se que a atividade inicial é baixa e vai elevando-se ao longo do processo de secagem, chegando a uma atividade específica máxima de 24 U/mg,

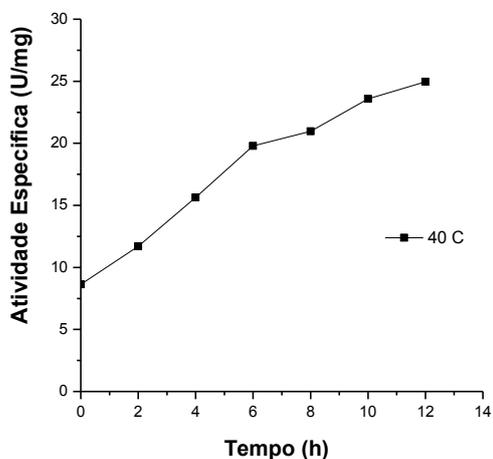


Figura 5.35: Perfil da atividade específica à 40°C.

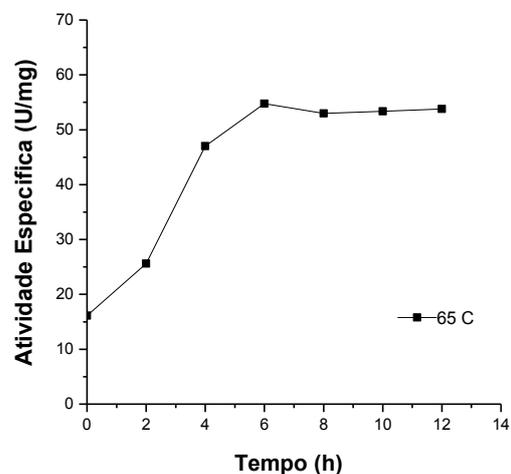


Figura 5.36: Perfil da atividade específica à 65°C.

O resultado apresentado não condiz com os resultados de alguns autores como SAWAI *et al.*, 2003, que afirmam que algumas reações enzimáticas envolvendo lípases são afetadas a uma temperatura de 30° a 40°C. Enquanto KRISHNAMURTHY (2008) verificou que as reações enzimáticas submetidas a 6 minutos de radiação infravermelha com ondas longas apresentaram uma redução de 60% na atividade lipolítica. Sendo que o aparelho de infravermelho utilizado no presente experimento era de ondas curtas.

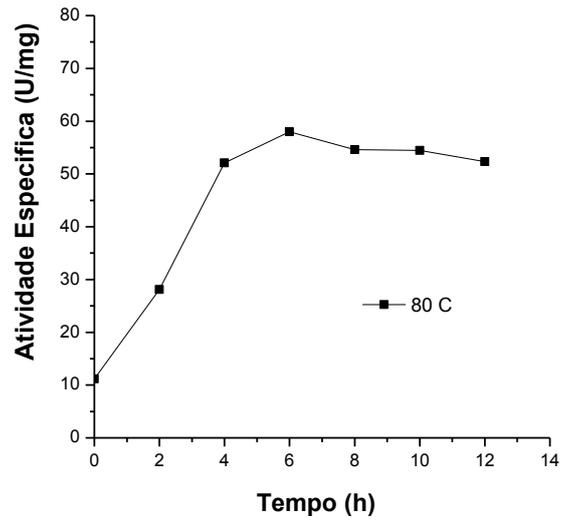


Figura 5.37: Perfil da atividade específica à 80°C.

6.0. CONCLUSÃO

Baseado nas análises dos resultados pode-se concluir que a bactéria Biopetro 4 apresenta grande capacidade de produção de enzimas lipolíticas em condições adequadas de concentração do indutor, pH, temperatura, adição de surfactante, concentração do surfactante pré-purificação e secagem. Neste sentido conclui-se:

- A concentração de 4% (v/v) de óleo de palma como indutor produz a maior atividade enzimática (3455 U/mL);
- As condições de fermentação pH 7,0 e temperatura de 37°C promovem a obtenção da maior atividade lipolítica (4617 U/mL);
- A adição de surfactante no caldo a ser fermentado aumentou a atividade enzimática, quando Triton X-100 e Tween 80 foram utilizados, rendendo 7185,92 U/mL e 6882,78 U/mL, respectivamente. A adição de PEG não representou em melhora do processo de obtenção de lípase. A melhor concentração de surfactante para a obtenção da enzima é 1%.
- A utilização de sulfato de amônia na pré-purificação da lípase produzida precipita as proteínas contaminantes e não a enzima. A melhor concentração de saturação é 80%, com fatores de purificação de 4,07 e 2,09 vezes, para fermentações contendo Triton X-100 e Tween 80, respectivamente.
- Por meio dos resultados obtidos através da secagem enzimática, observou-se que as temperaturas de 65° e 80°C demonstraram serem mais eficientes do que a temperatura de 40°, já que a secagem foi mais rápida, como o esperado, e a atividade específica alcançada foi maior (54 U/mg e 58 U/mg, respectivamente) do que a temperatura mais baixa (24 U/mg).

7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Freeze-drying of nanocapsules: Impact of annealing on the drying process. *International Journal of Pharmaceutics*, v.324, 74–82, 2006.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U.A.; SCHIMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial: Fundamentos**. v.1. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001.

AKOH, C. C.; CHANG, S.W.; LEE, G.C.; SHAW, J. F. Enzymatic Approach to Biodiesel Production. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2007.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. *Planejamento e Otimização de Experimentos*. Campinas: Editora UNICAMP, 229, 1995.

BASRI, M.; YUNUS, W.Z.W.; YOONG, W.S.; AMPON, K.; RAZAK, C.N.A. e SALLEH, A.B. “Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on synthetic polymer beads for use in the synthesis of fatty esters”. *Journal of Chemical, Technology and Biotechnology*, v.66, 169-173, 1996.

BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial: Fundamentos**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001.

BURKERT, J.F de M. **Otimização das condições de produção da lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552**. Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas, SP. Brasil, 2003.

BURKERT, J.F de M.; MALDONADO, R.R.; MAUGERI, F.F.; RODRIGUES, M.I. Otimização da Agitação e Aeração na Produção da Lipase de *Geotrichum candidum* em Reator de Mistura. CD-Rom. Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM, 2003.

CARVALHO, N. B. ; SOUZA, R. L. ; LIMA, A.S. ; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F.; SOARES, C. M. F. Sequential production of amylolytic and lipolytic enzymes by bacterium strain isolated from petroleum contaminated soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008.

CARVALHO, A. F. A.; SILVA, T. M.; SILVA, R.; GOMES, E. Isolamento e Seleção de Linhagens Termofílicas Produtoras de Amilases. *VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. Anais Enzitec*, v.1, Rio de Janeiro, Brasil, 2003.

CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; SANT'ANNA JR, G.L.; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, v.4, 239–247, 2000.

CHEN, X.D.; PATEL, K.C. Micro-organism inactivation during drying of small droplets or thin-layer slabs – A critical review of existing kinetics models and an appraisal of the drying rate dependent model. *Journal of Food Engineering*, v.82, 1–10, 2007.

COSTA, V. E.U.; AMORIM, H. L. N. de. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos Gerais sobre a influência do solvente. *Química Nova*, v.22, Porto Alegre, Brasil, 1999.

CORZO, G. REVAH, S. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Bioresource Technology*. v. 70, p. 173-180, 1999.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO M. da G.; SOLDI, V. Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros. *Química Nova*, v.27, n^o4, 623-630, 2004.

DALMAU, E.; MONTESINOS, J.L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.26, 657–663, 2000.

DIAZ, J.C.M.; RODRIGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, 1042–1050, 2006.

ELLAIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; A. THAER TALEB, K. ADINARAYANA. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, v.39, 525–528, 2004.

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

FEDATTO, L.M. **Caracterização de Proteases Extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira.** Dissertação de Mestrado. ESALQ/CENA-USP, Piracicaba, SP, 2004.

FRANKS, F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, V.45, 221–229, 1998.

FREIRE, D.M.G.; GOMES, P.M.; BOM, E.P.S.; SANT'ANNA JR, G.L. Lipase production by a new promising strain of *Penicillium restrictum*. *Revista de Microbiologia*, v. 28, n.1, p.6, 1997.

FUCINOS, P.; ABADIN, C.M; SANROMAN, A.; LONGO, M.A.; PASTRANA, L.; RUA, M.L. Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterization. *Journal of Biotechnology*, v.117, 233–241, 2005.

GANDHI, N. N. “Applications of lipase”. *Journal of the American Oil Chemist Society*, v.74, n. 6, pp. 621 – 634, 1997.

GESSESSEA, A.; DUEHOLMB, T.; PETERSENA, S.B.; NIELSENB, P.R H. Lipase and protease extraction from activated sludge. *Water Research*, v. 37, 3652–3657, 2003.

GULATI, R.; ISAR, J.; KUMAR, V.; PRASAD, A. K.; PARMAR, V. S.; SAXENA, R. K. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. *Pure Appl. Chem.*, v. 77, p. 251–262, 2005.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. In: *Bioquímica das Fermentações*, 1982. p.56.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED,A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006.

HERNÁIZ, M. J.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V. Modification of purified lipases from *Candida rugosa* with polyethylene glycol: A systematic study. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, p.181–190, 1999.

HILLGREN, A.; LINDGREN, J.; ALDEN, M. Protection mechanism of Tween 80 during freeze–thawing of a model protein, LDH. *International Journal of Pharmaceutics*, v.237, 57–69, 2002.

HOJO, O. Estudo sobre a Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *Tese Doutorado* - Universidade Federal de São Carlos, 1997, 229p.

JAEGER, K.E.,; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu. R. Microbiol*, 315-351, 1999.

JAYARAMAN, K. S., GUPTA, D. K. Drying of Fruits and Vegetable. In: MUJUMDAR, A. S. **Handbook of Industrial Drying**. Nova Iorque: Marcel Dekker,1995. p. 643-665. Disponível em:

<http://books.google.com/books?id=uKOGg1vk61MC&printsec=frontcover&hl=pt-BR&sig=ACfU3U0lymW2aleSvsmjJipBUJCoO9A6Ag#PPP1,M1>. Arquivo capturado em 25 de junho de 2008.

KADER, R.; YOUSUF, A.; HOQ, M.M. Optimization of lipase production by *Rhizopus* MR 12 in shake culture. *Journal of Applied Sciences*, v.7, p. 855-860, 2007.

KAMINI, N.R.; MALA, J.G.S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger*, by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochemistry* v.33, n.5, 505-511, 1998.

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

KIELING, D. D. **Enzimas: Aspectos Gerais**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

KNOB, A.; TERRASAN, C.R.F.; CARMONA, E.C. Efeito das Condições de Cultivo e Fontes de Carbono na Produção de Xilanases por *Penicillium sclerotiorum*. CD-Rom. Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM. Paraná-PR, 2007.

KO, W.H.; WANG, I.T.; ANN, P.J. A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil Biology & Biochemistry*, v.37, 597–599, 2005.

KOUTINAS, A.A.; WANG, R.; WEBB, C. Estimation of fungal growth in complex, heterogeneous culture. *Biochemical Engineering Journal*, v.14, 93–100, 2003.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**, v.1, ed.2, São Paulo: Edgard Blücher Ltda, p. 262, 1993.

LI, C.-Y.; CHENG, C.-Y.; CHEN, T.-L. Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase using Tween 80 as the carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, v.29, 258–263, 2001.

LIN, S.-F.; CHIOU, C.-M.; TSAI, Y.-C. Effect of Triton X-100 on Alkaline Lipase Production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Biotechnology Letters*, v. 30, p. 959-962, 1995.

LIU, Z.; CHI, Z.; JING LI, L. W. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. *Biochemical Engineering Journal*, v. 40, 445-451, 2008.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p. 265–275, 1951.

MAIA, M.M.D.; MORAIS, M.M.C.; MORAIS JR., M.A.; MELO, E.H.M.; LIMA FILHO, J.L. Production of Extracellular Lipase by the Phytopathogenic Fungus *Fusarium Solani* Fs1. *Revista de Microbiologia*, v.30, 304-309, 1999.

MAIA, M.M.D.; HEASLEY, A.; MORAIS, M.M.C.; MELO, E.H.M.; MORAIS JR, M.A.; LEDINGHAM, W.M.; LIMA FILHO, J.L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresource Technology*, v.76, 23-27, 2001.

MAHADIK, N.D.; BASTAWDE, K.B.; PUNTAMBEKAR, U.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, v.39, 2031–2034, 2004.

MATSUSHIMA, A.; KODERA, Y.; HIROTO, M.; NISHIMURA, H.; INADA, Y. Bioconjugates of proteins and polyethylene glycol: potent tools in biotechnological processes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.2, 1-17, 1996.

MAYORDOMO, I.; RANDEZ-GIL, F.; PRIETO, J. A. Isolation, Purification, and Characterization of a Cold-Active Lipase from *Aspergillus nidulans*. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, p. 105-109, 2000.

MENDES, A.A.; CASTRO, H.F.; PEREIRA, E.B.; FURIGO JÚNIOR, A. Aplicação de Lipases no Tratamento de Águas Residuárias com Elevados Teores de Lipídeos. *Química Nova*, v.28, n.2, 296-305, 2005.

MURATORI, I.G.; FEITOSA, I.C.; SOUZA, R.L.; MOTA, W.S.; SOARES, C.M.F.; LIMA, A.S. Produção de lipase em fermentação submersa utilizando diferentes óleos vegetais. *Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ)*, 2008.

NOEL, M.; COMBES, D. *Rhizomucor miehei* lipase: differential scanning calorimetry and pressure/temperature stability studies in presence of soluble additives. *Enzyme and Microbial Technology*, v.33, p. 299–308, 2003.

NOOR, I.M.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K.B. Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by Lipase. *Process Biochemistry*, v.39, 13-20, 2003.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Plant lipases from latex: properties and industrial applications. *Química Nova*, vol. 29, nº 1. São Paulo, 2006.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, v.77, p.149-162,1999.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S. Isolation and Characterization of Three Distinct forms of Lipases from *Candida rugosa* Produced in Solid State Fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.43, n.5, Curitiba, 2000.

PASTORE, G.M.; COSTA, V.S.R.; KOBLITZ, M.G.B. Purificação Parcial e Caracterização Bioquímica de Lipase Extracelular Produzida por Nova Linhagem de *Rhizopus* sp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.23, n.2, Campinas, 2003.

PINHEIRO, T.L.F. **Produção de Lipases por Fermentação em Estado Sólido e Fermentação Submersa utilizando *Penicillium Verrucosum* como Microrganismo.** Tese de Mestrado, Universidade Regional Integrada, Erechim, RS, Brasil, 2006.

RAJ, R. P.; CHAKRABORTY, K. An extra-cellular alkaline metalloproteinase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: Purification and biochemical characterization. *Food Chemistry*, v. 109, p. 727–736, 2008.

SANROMAN, M.A.; COUTO, S.R. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *Journal of Food Engineering* 76, 291–302, 2006.

SAXENA, R.K.; GHOSH, P.K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W.S.; BARODOO, S.; GULATI, R. Microbial lipase: potential biocatalyst for the future industry. *Current Science*, v.77, 101–115, 1999.

SAXENA, R. K.; DAVIDSON, W.S.; SHEORAN, A.; BHOOPANDER, G. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneous*. v.39, p.239-247, 2003.

SCRIBAN, E. **Biotecnologia.** Editora Malone: São Paulo, p. 498, 1985.

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

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

SOARES, C.M.F. **Otimização por Planejamento Experimental da Imobilização de Lipase em Sílica de Porosidade Controlada na Presença de Estabilizantes.** Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Campinas, SP. Brasil, 2000.

SOARES, C.M.F.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F. de; ZANIN, G.M. Characterization

and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Biochemistry and Biotechnology*, v. 77-79, p. 745-758, 1999.

SOCCOL??????????????

SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane Bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, 69±80, 2000.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, 205–218, 2003.

SPIER, M.R. **Produção de Enzimas Amilolíticas Fúngicas A-Amilase e Amiloglicosidase por Fermentação no Estado Sólido.** Dissertação de Mestrado. UFPR, PR, Brasil, 2005.

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

TUMANG, T. R.; COSTA, É. S. da. Maldi-tofms aplicada à produção, purificação e caracterização de lipases de interesse biotecnológico. XIV Seminário de Iniciação Científica. PIBIC –PUC-RIO, 2006.

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

YASUDA, M.; KIGUCHI, T.; KASAHARA, H.; OGINO, H. ; ISHIKAWA, H. Effect of Additives on Transesterification Activity of *Rhizopus chinensis* Lipase. *Journal of Bioscience and bioengineering*, v.90, 681-683, 2000.

ZHANG, L.Y.; WEI, D.Z.; TONG, W.Y. Effective inducers for lipase production by *Candida rugosa*. *Annals of Microbiology*, v. 53, p. 499-504, 2003.

