

**UFRRJ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**TESE**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPASE DE *Aspergillus niger*  
OBTIDA POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO  
RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA**

**Lívia Nolasco Macedo Muruci**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPASE DE *Aspergillus niger*  
OBTIDA POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO  
RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA**

**LÍVIA NOLASCO MACEDO MURUCI**

*Sob a orientação da professora*  
**DSc. Mônica Caraméz Triches Damaso**

*Co-orientação da Professora*  
**DSc. Sonia Couri**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção de Grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós - Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ  
Dezembro de 2012

572.7  
M984p  
T

Muruci, Livia Nolasco Macedo, 1982-

Produção e caracterização de lipase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação no estado sólido utilizando resíduos da agroindústria / Livia Nolasco Macedo Muruci – 2012.

107 f.: il.

Orientador: Mônica Caraméz Triches Damaso.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Bibliografia: f. 70-86.

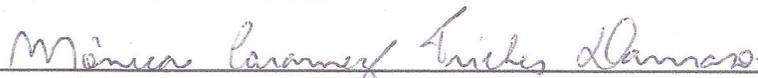
1. Enzimas de fungos - Teses. 2. Enzimas – Aplicações industriais – Teses. 3. Lipase - Biotecnologia – Teses. 4. Fermentação – Teses. 5. Resíduos agrícolas – Teses. 6. Tecnologia de alimentos – Teses. I. Damaso, Mônica Caraméz Triches, 1973-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

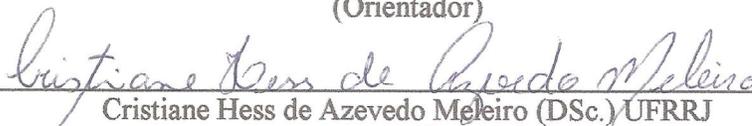
**LÍVIA NOLASCO MACEDO MURUCI**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos.

TESE APROVADA EM 10/12/2012



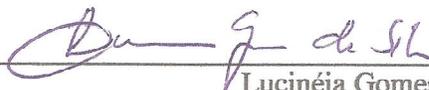
Mônica Caramez Triches Damaso (DSc.) Embrapa Agroenergia  
(Orientador)



Cristiane Hess de Azevedo Meleiro (DSc.) UFRRJ  
(Membro Titular)



Edmar das Mèrces Penha (DSc.) Embrapa Agroindústria de Alimentos  
(Membro Titular)



Lucinéia Gomes da Silva (DSc.) IFRJ  
(Membro Titular)



Marcelo Elias Fraga (DSc.) UFRRJ  
(Membro Titular)

Ao meu marido, aos meus pais e irmãs, por todo o amor dedicado, incentivo constante, força  
e amizade!

Amo muito todos vocês!

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

*À Deus, por todas as bênçãos concedidas, por sempre iluminar meu caminho e me dar forças para alcançar meus objetivos.*

*Ao meu amado marido **Rodrigo**, pelo amor, cumplicidade, companheirismo e por acreditar em mim sempre.*

*Aos meus preciosos pais **Ana Maria e Gilson**, que nunca mediram esforços para nos proporcionar tudo de melhor. Obrigada por todo investimento na minha educação, pelo incentivo e principalmente pelo amor incondicional.*

*Às minhas amadas e maravilhosas irmãs que tanto amo, **Laís e Luciana** pela grande amizade, pela torcida, pela confiança, pelo apoio, carinho e grande amor que dedicamos umas às outras.*

*À minha orientadora **Dra. Mônica Damaso**, pelo exemplo de profissionalismo, atenção e por todos os ensinamentos compartilhados ao longo desses quatro anos.*

*À **Dra. Sonia Couri**, pela excelente co-orientação ao longo de todo o trabalho.*

*Aos pesquisadores do Laboratório de Processos Fermentativos da Embrapa Agroindústria de Alimentos **Dr. Edmar Penha, Dra. Leda Gottschalk e Dra. Janine Passos**, por toda ajuda e colaboração ao longo de toda a pesquisa.*

*Aos professores **Dra. Lucielen dos Santos** pela grande contribuição nas análises estatísticas, ao professor **Dr. Marcelo Fraga** pela colaboração na identificação da cultura fúngica e a **Dra. Rosemar Antoniassi** pela colaboração na realização das análises cromatográficas.*

*Aos colegas de mestrado e doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos – UFRRJ em especial: **Regiane Ribeiro e Juan Ruano**, pela grande contribuição nas análises estatísticas, pela parceria, amizade e troca de experiências.*

*Às estagiárias do Laboratório de Processos Fermentativos da Embrapa Agroindústria de Alimentos, **Maíra Oliveira e Ludmila Araújo**, pela amizade conquistada ao longo dos meses e, sobretudo pela indispensável ajuda nos experimentos.*

*Às técnicas do Laboratório de Processos Fermentativos da Embrapa Agroindústria de Alimentos **Érika Fraga**, pela amizade e grande auxílio nos experimentos e pelos bons momentos de descontração e **Selma Terzi**, pelo apoio técnico.*

*Aos funcionários e estagiários da **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, meus sinceros agradecimentos pela colaboração e gentileza de emprestar os equipamentos.*

*Às **Indústrias Bunge Alimentos S/A e Granfino S/A** pela gentileza de ceder amostras necessárias e indispensáveis à realização desse trabalho.*

*A todos os **Professores** do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ por todo o conhecimento e experiência compartilhados ao longo dos anos.*

*A todos os **amigos** que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho o meu **muito obrigado!!!***

## RESUMO

MURUCI, Livia Nolasco Macedo. **Produção e caracterização de lipase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação no estado sólido utilizando resíduos da agroindústria.** 2012. 95p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

As lipases constituem um importante grupo de enzimas, principalmente por apresentarem grande versatilidade de aplicações. São enzimas que além de catalisar a hidrólise de óleos e gorduras, catalisam reações inversas, como esterificação, transesterificação e interesterificação. A produção de lipases por fermentação no estado sólido (FES) tem recebido grande atenção, principalmente pela possibilidade de utilizar resíduos agroindustriais. O objetivo deste trabalho foi produzir, concentrar e caracterizar lipase de *Aspergillus niger* obtida por (FES), utilizando borras alcalinas e farelo de trigo. A produção da enzima foi conduzida em colunas aeradas a 32°C, por 48 horas. Primeiramente, para selecionar as variáveis que influenciavam de forma significativa a produção de lipases foi conduzido um planejamento experimental de Plackett & Burman. Foram avaliadas quatro variáveis de processo: concentração de inóculo e de indutor (borra de milho e óleo de oliva), volume de solução de sulfato de amônio e aeração. Com base nos resultados obtidos, foi realizado o delineamento fatorial completo 2<sup>2</sup> que visou melhorar a produção da enzima. Neste caso, foram estudadas duas variáveis independentes: aeração em vvm (0; 0,5; 1) e concentração de borra de milho em % p/p (0; 0,5; 1). Resultados obtidos revelaram que a maior atividade lipásica (215 U/gms) e específica (11392 U/g de proteína) foram obtidas no ensaio 4 (1,0% de borra de milho, 1,0 vvm de aeração, 60 mL de solução de sulfato de amônio e 10<sup>6</sup> esporos/g de meio). Em seguida, a produção da enzima ocorreu em condições selecionadas como ótimas, testando-se outras duas borras: girassol e canola, além da borra de milho e na ausência de indutor. Verificou-se que a maior atividade lipásica (254 U/gms) foi obtida sem o uso de borra. Portanto, a presença das borras é dispensável para a produção de lipase de *A. niger*, nas condições estudadas. Um estudo cinético demonstrou que a produção de lipase ocorreu associada ao crescimento fúngico, e a maior produtividade (4 U/gms.h) ocorreu em 48 horas de fermentação, na ausência de borra. Em seguida, foi realizada a concentração enzimática por precipitação com sulfato de amônio em quatro condições de saturação (40, 60, 80 e 90%), e foram observados melhores resultados com 90% de saturação. O extrato enzimático também foi concentrado por liofilização. A caracterização parcial da enzima foi realizada com amostras concentradas. A lipase apresentou atividade ótima a pH entre 3,0 e 5,6 e a temperaturas de 30 a 55°C. Apresentou perfil de termoestabilidade semelhante para as temperaturas de 30, 40 e 50°C, restando cerca de 42% de sua atividade por até 30 horas de incubação. Embora o perfil de estabilidade ao pH também tenha sido semelhante para os valores testados, após 30 horas de incubação, as maiores atividades lipásicas residuais foram observadas em pH ácido: pH 3,0 (59%), pH 4,0 (55%) e pH 5,0 (62%). A enzima manteve 100% da atividade em 150 dias estocada a -18°C. A avaliação da especificidade sob diferentes óleos vegetais demonstrou maior atividade hidrolítica sob o óleo de coco (201 U/mL). Portanto, sugere-se que a enzima possua afinidade por ácidos graxos de cadeia média.

**Palavras-chave:** enzima, fungos filamentosos, planejamento experimental, borras alcalinas.

## ABSTRACT

MURUCI, Livia Nolasco Macedo. **Production and characterization of *Aspergillus niger* lipase obtained by solid state fermentation using agroindustrial residues.** 2012. 95p. Thesis (DSc. in Food Science and Technology). Institute of Technology, Department of Food Technology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Lipases are an important group of enzymes, mainly because of the great versatility of applications. They are enzymes that, besides catalyzing the hydrolysis of oils and fats, catalyze reverse reactions, such as esterification, transesterification and interesterification. The lipase production by solid state fermentation (SSF) has received great attention, mainly by the possibility of using agroindustrial coproducts. The aim of this work was to produce, concentrate and characterize lipase of *Aspergillus niger* obtained by (SSF), using alkaline soapstocks and wheat bran. The enzyme production was performed in aerated columns at 32°C for 48 hours. First, in order to select the variables that significantly influenced the production of lipases, an experimental Plackett & Burman planning was conducted. Four process variables were evaluated: inoculum and inducer concentration (corn soapstock and olive oil), volume of solution of ammonium sulfate and aeration. Based on the results obtained, a full factorial design that aimed to improve the production of the enzyme was performed. In this case, two independent variables were studied: aeration, in vvm (0, 0.5, 1) and concentration of corn soapstock % w/w (0, 0.5, 1). Results obtained showed that the highest lipase activity (215 U/gds) and specific activity (11392.1 U/g protein) were obtained in test 4 (1.0% corn soapstock, 1.0 vvm aeration, 60 mL of solution of ammonium sulfate and 10<sup>6</sup> spores/g medium). Then, the enzyme production occurred in conditions selected as optimal and other two samples of soapstock were tested: sunflower and canola, besides corn soapstock and in the absence of inducer. It was found that the highest lipase activity (254.4 U/gds) was obtained without the use of soapstock. Therefore, its presence is dispensable for the production of lipase *A. niger* under the conditions studied. A kinetic study showed that the lipase production occurred associated with fungal growth and an increased productivity (4 U/gds.h) occurred in 48 hours of fermentation in the absence of soapstock. Then, the enzyme concentration was performed by precipitation with ammonium sulfate in four saturation conditions (40, 60, 80 and 90%), and it was observed that best results were obtained with 90% saturation. The enzyme extract was also concentrated by lyophilization. Partial characterization of the enzyme was carried out with concentrated samples. The lipase showed optimum activity at pH between 3.0 and 5.6 and temperatures of 30 to 55°C. It presented thermostability profile similar to the temperatures of 30, 40 and 50°C, retaining about 42% of its activity for up to 30 hours of incubation. While the pH stability profile was also similar to the values tested after 30 h of incubation, the higher residual lipase activities were observed at acidic pH: pH 3.0 (59%), pH 4.0 (55%) and pH 5.0 (62%). The enzyme retained 100% of activity in 150 days stored at -18° C. The evaluation of the specificity in different vegetable oils showed higher hydrolytic activity in coconut oil (201 U/mL). Therefore, it is suggested that the enzyme has an affinity for the medium chain fatty acids.

**Keywords:** enzyme, filamentous fungi, experimental design, alkaline soapstocks.

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação das enzimas de acordo com a IUB	5
<b>Tabela 2.</b> Enzimas de diferentes espécies microbianas produzidas por fermentação no estado sólido	6
<b>Tabela 3.</b> Principais lipases comerciais produzidas por diferentes empresas	9
<b>Tabela 4.</b> Principais aplicações das lipases no setor alimentício	13
<b>Tabela 5.</b> Estudos da produção de lipase em FES utilizando resíduos agroindustriais e diferentes microrganismos	20
<b>Tabela 6.</b> Matérias-primas empregadas para a produção de lipase de <i>Aspergillus niger</i> por fermentação no estado sólido (FES)	28
<b>Tabela 7.</b> Composição do meio de ativação do microrganismo	29
<b>Tabela 8.</b> Resultados das análises físico-químicas realizadas nas borras	30
<b>Tabela 9.</b> Níveis e variáveis estudadas no planejamento de Plackett & Burman para a seleção de variáveis que influenciam na produção de lipase	32
<b>Tabela 10.</b> Matriz gerada para o planejamento experimental de Plackett & Burman para a produção de lipase com seus níveis codificados e valores reais (entre parênteses)	32
<b>Tabela 11.</b> Níveis e variáveis estudadas no planejamento fatorial completo $2^2$ para o melhoramento das condições de produção de lipase	33
<b>Tabela 12.</b> Matriz gerada para o delineamento fatorial completo $2^2$ com seus níveis codificados e valores reais (entre parênteses)	33
<b>Tabela 13.</b> Níveis e variáveis estudadas no delineamento composto central rotacional (DCCR $2^2$ ) para avaliação da temperatura e pH ótimos da lipase de <i>A. niger</i>	38
<b>Tabela 14.</b> Matriz do delineamento composto central rotacional $2^2$ com seus níveis codificados e reais para avaliação da temperatura e pH ótimos da lipase de <i>A. niger</i>	38
<b>Tabela 15.</b> Matriz do planejamento experimental de Plackett & Burman com seus níveis codificados e reais e com as respostas de atividade lipásica (U/gms) e específica aparente (U/g de proteína) para os indutores óleo de oliva e borra de milho, após 48h de fermentação	42
<b>Tabela 16.</b> Estimativa dos efeitos de atividade lipásica (U/gms) e específica aparente (U/g de proteína) utilizando borra de milho como fonte indutora para a produção de lipase de <i>A. niger</i> por FES	44
<b>Tabela 17.</b> Estimativa dos efeitos de atividade lipásica (U/gms) e específica aparente (U/g de proteína) utilizando óleo de oliva como fonte indutora para a produção de lipase de <i>A. niger</i> por FES	45

<b>Tabela 18.</b> Matriz para o delineamento fatorial completo $2^2$ com seus níveis codificados e reais e com as respostas de atividade lipásica (U/gms) e específica aparente (U/g de proteína) para o indutor borra de milho, após 48h de fermentação	46
<b>Tabela 19.</b> Coeficiente de regressão e desvio padrão do primeiro planejamento fatorial completo ( $2^2$ ), para a atividade lipásica (U/gms) e específica aparente (U/g de proteína)	47
<b>Tabela 20.</b> Análise de variância do primeiro delineamento fatorial completo $2^2$ para atividade lipásica de <i>A. niger</i>	47
<b>Tabela 21.</b> Atividade lipásica (U/mL) dos ensaios do primeiro fatorial completo	49
<b>Tabela 22.</b> Matriz para o segundo delineamento fatorial completo $2^2$ com seus níveis codificados e reais e com as respostas de atividade lipásica U/gms e específica aparente U/g de proteína para o indutor borra de milho, após 48h de fermentação	50
<b>Tabela 23.</b> Médias da produção de lipase em 48 h utilizando as diferentes borras de refino de óleo e os resultados do Teste de Tukey	51
<b>Tabela 24.</b> Avaliação da recuperação enzimática e do fator de purificação obtidos para a técnica de concentração por precipitação com sulfato de amônio a 40, 60, 80 e 90% de saturação e pela técnica de liofilização	56
<b>Tabela 25.</b> Matriz do delineamento composto central rotacional $2^2$ com seus níveis codificados e reais da avaliação da temperatura e pH ótimos na atividade lipásica de <i>A. niger</i>	58
<b>Tabela 26.</b> Coeficientes de regressão e desvios padrão do planejamento fatorial composto central rotacional $2^2$ da avaliação da temperatura e pH ótimos na atividade lipásica (U/mL) de <i>A. niger</i>	59
<b>Tabela 27.</b> Análise de variância da temperatura e pH ótimos na atividade lipásica de <i>A. niger</i>	59
<b>Tabela 28.</b> Perfil em ácidos graxos dos óleos de oliva, girassol e coco	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principais reações catalisadas por lipases	11
<b>Figura 2.</b> Estrutura microscópica de <i>A. niger</i>	24
<b>Figura 3.</b> Fluxograma das etapas realizadas ao longo do trabalho	27
<b>Figura 4.</b> Borra de girassol (A), borra de canola (B), borra de milho (C)	29
<b>Figura 5.</b> Aparato instrumental para a fermentação de lipase conduzida em colunas aeradas. Rotâmetros (A), banho termostatizado (B), colunas contendo meio de cultivo já fermentado (C)	31
<b>Figura 6.</b> Meio reacional (A), reação de hidrólise em banho Maria a 35°C com agitação (B)	35
<b>Figura 7.</b> Curva de contorno para atividade lipásica U/gms	48
<b>Figura 8.</b> Perfil cinético da produção de lipase de <i>A. niger</i> em FES na ausência de borra.	54
<b>Figura 9.</b> Perfil cinético da produção de lipase de <i>A. niger</i> em FES na presença de 1% de borra de canola	55
<b>Figura 10.</b> Perfil cinético da produção de protease no extrato enzimático em FES na presença de 1% de borra de canola e sem indutor	55
<b>Figura 11.</b> Atividade lipásica (U/mL) dos sobrenadantes e do precipitado para as condições de 40, 60, 80 e 90% de saturação	57
<b>Figura 12.</b> Atividade específica U/g de proteína dos sobrenadantes e do precipitado para as condições de 40, 60, 80 e 90% de saturação	57
<b>Figura 13.</b> Curva de contorno para a atividade lipásica de <i>A. niger</i> em função das variáveis temperatura e pH.	59
<b>Figura 14.</b> Termoestabilidade da lipase de <i>A. niger</i>	61
<b>Figura 15.</b> Estabilidade da lipase de <i>A. niger</i> ao pH a 20°C	62
<b>Figura 16.</b> Estabilidade da lipase de <i>A. niger</i> a estocagem em geladeira a 5°C	63
<b>Figura 17.</b> Avaliação da atividade hidrolítica de lipase de <i>A. niger</i> liofilizada sobre diferentes óleos. Os resultados são médias de quatro repetições em triplicata	65
<b>Figura 18.</b> Câmara de Neubauer	88

## LISTA DE ABREVIÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>CV%</b>	Coefficiente de variação
<b>Da</b>	Dalton (unidade de massa molecular)
<b>DCCR</b>	Delineamento central composto rotacional
<b>FES</b>	Fermentação no estado sólido
<b>FS</b>	Fermentação submersa
<b>gms</b>	Grama de massa seca
<b>IUB</b>	União Internacional de Bioquímica
<b>L</b>	Litro
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>min</b>	Minutos
<b>Mm</b>	Milímetro
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino p. a.
<b>SSA</b>	Solução de sulfato de amônio
<b>U</b>	Unidade de atividade enzimática
<b>U/gms</b>	Unidade de atividade enzimática por grama de massa seca
<b>U/gms.h</b>	Unidade de atividade lipásica por grama de meio seco por hora
<b>IU</b>	Unidade Internacional (para quantificação de atividade enzimática)
<b>VSSA</b>	Volume de solução de sulfato de amônio (mL)
<b>vvm</b>	Volume de ar por volume de meio por minuto

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 OBJETIVOS</b>	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b>	4
3.1 Enzimas	4
3.2 Lipases	7
3.3 Reações Catalizadas por Lipases	10
3.4 Aplicações Biotecnológicas das Lipases	11
3.4.1 Indústria alimentícia	12
3.4.2 Indústria de detergentes	13
3.4.3 Curtumes	14
3.4.4 Tratamento de efluentes	14
3.4.5 Produção de biodiesel	15
3.4.6 Indústria farmacêutica	16
3.4.7 Outras aplicações	16
3.5 Processos Fermentativos para a Produção de Lipases	16
3.5.1 Características gerais da FES	17
3.5.2 Características gerais da fermentação submersa (FS)	21
3.6 Fungos Filamentosos Utilizados para a Produção de Lipases	21
3.6.1 <i>Aspergillus niger</i>	23
3.7 Concentração Enzimática	24
3.8 Caracterização de Lipases	25
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	27
4.1 Microrganismo	28
4.2 Matérias-primas	28
4.3 Estocagem e Ativação do Microrganismo	29
4.4 Propagação de Esporos	28
4.5 Preparo do Inóculo para ser Utilizado na Fermentação	30
4.6 Microrganismo Meio de Fermentação para a Produção de Lipase em FES	30
4.7 Avaliação do Teor de Óleo Presente no Farelo de trigo	30
4.8 Composição das Borrás Alcalinas Realizada por Santos (2012)	30
4.9 Condução da Fermentação para a Produção de Lipase	31
4.10 Obtenção do Extrato Enzimático	31
4.11 Estudo da Produção de Lipase por <i>A. niger</i> em FES e em Colunas Aeradas utilizando Planejamento de Experimentos	31
4.11.1 Delineamento de Plackett & Burman	31
4.11.2 Delineamento fatorial completo 2 <sup>2</sup>	32
4.12 Produção de Lipases Empregando Distintas Borrás Alcalinas	33
4.13 Cinética da Produção de Lipase por <i>A. niger</i> em FES e em Colunas Aeradas utilizando Planejamento de Experimentos	33
4.13.1 Determinação do crescimento microbiano	34
4.14 Determinação da Atividade Lipásica	34
4.15 Determinação de Proteínas Totais	35
4.16 Determinação da Umidade	35
4.17 Atividade Lipásica Específica Aparente	36

4.18 Determinação da Atividade Proteásica	36
4.19 Concentração do Extrato Enzimático	36
4.19.1 Precipitação com sulfato de amônio	36
4.19.2 Concentração por liofilização	37
4.20 Caracterização Bioquímica da Lipase	37
4.20.1 Determinação da temperatura e pH ótimos	37
4.20.2 Determinação da termoestabilidade	38
4.20.3 Determinação da estabilidade ao pH	38
4.20.4 Determinação da estabilidade a estocagem	38
4.20.5 Perfil de ácidos graxos de diferentes óleos e especificidade enzimática	39
4.20.5.1 Composição dos óleos	39
4.20.5.2 Especificidade	39
4.21 Estatística	39
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	40
5.1 Avaliação do Teor de Óleo Presente no Farelo de Trigo Utilizado como Matéria- prima para a FES	40
5.2 Estudo da Produção de Lipase	40
5.2.1 Planejamento de Plackett & Burman	40
5.2.2 Primeiro delineamento fatorial completo	45
5.2.3 Segundo delineamento fatorial completo	49
5.3 Produção de Lipases com Distintas Borrás alcalinas	50
5.4 Cinética de Produção da Lipase Utilizando Borra de Canola e na Ausência de Indutor	53
5.5 Concentração do Extrato Enzimático	56
5.6 Caracterização Bioquímica da Lipase	58
5.6.1 Determinação da temperatura e pH ótimos	58
5.6.2 Determinação da termoestabilidade	60
5.6.3 Determinação da estabilidade ao pH	61
5.6.4 Determinação da estabilidade a estocagem sob refrigeração e congelamento	62
5.7 Perfil de ácidos graxos de diferentes óleos e especificidade enzimática	63
5.7.1 Composição dos óleos	63
5.7.2 Avaliação da especificidade da lipase de <i>A. niger</i> sob diferentes óleos vegetais	64
<b>6 CONCLUSÕES</b>	67
<b>7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	69
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	70
<b>ANEXOS</b>	87
Anexo A - Cálculo da Contagem de Esporos/g de meio	88
Anexo B - Preparo de Solução Tampão Fosfato de Sódio 0,1M	89
Anexo C - Curva Padrão de Glicosamina	90
Anexo D - Preparo de Solução Tampão Citrato de Sódio 0,05M	91
Anexo E - Cálculos para Transformação de Atividade em U/mL para Atividade em U/g massa seca (U/gms)	92
Anexo F - Curva Padrão de Proteína	93
Anexo G - Reagentes e seus Respectivos Fornecedores	94
Anexo H - Equipamentos e seus Respectivos Fabricantes	95

## 1 INTRODUÇÃO

Lipases são enzimas pertencentes à família das hidrolases (glicerol éster hidrolases E. C. 3.1.1.3) que tem como função biológica primordial catalisar a hidrólise de óleos e gorduras liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Além disso, em baixas concentrações de água podem catalisar reações de esterificação, transesterificação e interesterificação. São biocatalisadores extremamente versáteis, podendo atuar em uma ampla faixa de pH e temperatura, inclusive valores extremos de atuação já foram reportados na literatura.

Características como a estabilidade a solventes orgânicos, não exigência de cofatores e especificidade ao substrato, tornam essas enzimas bastante atrativas para o setor de biotecnologia. O interesse da utilização de enzimas na indústria em substituição aos catalisadores químicos pode ser justificado, dentre outros fatores, pela sua biodegradabilidade e a crescente preocupação com o meio ambiente em todos os segmentos.

As lipases são as enzimas mais utilizadas em síntese orgânica e podem ser obtidas de tecidos animais, vegetais e de microrganismo, sendo que as suas propriedades variam de acordo com a fonte de obtenção.

As lipases de origem microbiana são as mais utilizadas industrialmente, pois apresentam grande variedade de atividade catalítica e são mais estáveis quando comparadas com lipases de outras fontes. Além disso, a produção de enzimas microbianas não estão sujeitas às limitações devido à sazonalidade, possuem maior facilidade de cultivo e os meios utilizados para a sua obtenção são geralmente de baixo custo, principalmente aqueles oriundos das agroindústrias.

Dentre as fontes microbianas, os fungos filamentosos são os melhores produtores de lipases, principalmente aqueles pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor* e *Thermomyces*.

O fungo filamentoso *Aspergillus niger* é uma das espécies mais estudadas, está amplamente distribuída na natureza, estando presente na superfície terrestre, no ar e na água. É considerado um bom produtor de lipase extracelular e possui habilidade em fermentar grande variedade de matérias - primas. Além disso, é uma das poucas espécies de fungos que receberam o status de GRAS (generally regarded as safe) conferido pela Food and Drug Administration (FDA).

É sabido que uma mesma espécie microbiana pode produzir enzimas com características completamente ou parcialmente diferenciadas. Portanto, a busca por novas linhagens potenciais produtoras de lipases tem crescido nos últimos anos, uma vez que o microrganismo utilizado é fundamental para alcançar o sucesso dos bioprocessos. Além disso, novas tecnologias como a recombinação gênica, a engenharia de proteínas e a evolução dirigida propiciam a obtenção de enzimas com maior estabilidade, seletividade e especificidade, e dessa forma, promovem a diversificação da aplicação enzimática.

A produção de lipases pode ser realizada por dois métodos: fermentação submersa (FS) e por fermentação no estado sólido (FES), sendo este último empregado no presente trabalho.

A fermentação no estado sólido tem ganho atenção dos pesquisadores nos últimos 20 anos. A técnica de FES envolve o crescimento e metabolismo dos microrganismos na ausência ou quase ausência de água livre, empregando um substrato sólido ou suporte.

A FES apresenta uma série de vantagens sobre a fermentação submersa, como por exemplo, menor demanda de energia, maior produtividade, utilização de meios mais simples e de baixo custo, possibilita maiores semelhanças com o habitat da maioria dos fungos filamentosos, os quais são capazes de crescer em baixas concentrações de atividade de água e

o biocatalisador geralmente é produzido de forma mais concentrada, o que facilita a sua recuperação do meio de cultura.

O meio de cultura utilizado em uma fermentação deve atender à demanda nutricional do microrganismo produtor, aos objetivos do processo e à escala de operação, e pode representar até 70% dos custos gerados. No Brasil, país com abundância em agroindústrias, a utilização de resíduos como substrato para a produção de bioprodutos, como enzimas, contribuem para a redução dos custos dos bioprocessos e para a despoluição ambiental, além de agregar valor a esses materiais. Neste contexto, a fermentação no estado sólido (FES) é uma alternativa interessante para a produção de enzimas.

Dentre os resíduos gerados pelas indústrias alimentícias, encontram-se quantidades apreciáveis de farelos, tortas, cascas, caroços e borras. Esses materiais, além de fonte de matéria orgânica, podem ser utilizados como fonte de proteínas, lipídeos e óleos essenciais, os quais são passíveis de recuperação e aproveitamento.

A borra alcalina é um resíduo gerado pelas indústrias de refino de óleos comestíveis durante a etapa de neutralização alcalina do óleo. Ela consiste de uma mistura de sabão, óleo arrastado, substâncias insaponificáveis, gomas, fosfatídeos, pigmentos, água e ácidos graxos. Além da importância da seleção das matérias-primas e/ou meios cultivados para a produção enzimática, outros fatores são de extrema importância para garantir o sucesso dos bioprocessos, como por exemplo: seleção da linhagem microbiana, concentração de inóculo, composição do meio de fermentação, aeração, pH do meio, temperatura, entre outros fatores, tornando-se essencial a definição das condições que maximizem a produção de enzimas.

Neste sentido, no presente trabalho foram realizados estudos a fim de alcançar melhores condições de produção de lipase de *A. niger*, utilizando a ferramenta estatística de delineamentos experimentais. O uso de ferramentas estatísticas, como delineamentos de Plackett & Burman e planejamento fatorial completo, possibilita um menor número de experimentos quando comparado às metodologias convencionais, permitindo a investigação do processo em uma ampla faixa de variação, com redução de tempo e custos, tornando essa ferramenta bastante atrativa para a produção enzimática.

As lipases possuem inúmeras aplicações: podem ser utilizadas na modificação de óleos e gorduras, na formulação de detergentes, na fabricação de alimentos, na fabricação de papel, na indústria farmacêutica, nos curtumes, no tratamento de efluentes e na produção de biodiesel. No entanto, a aplicação das enzimas depende também da sua pureza, sendo a precipitação com sulfato de amônio uma das técnicas iniciais mais eficientes e utilizadas na etapa de pré-purificação ou concentração de enzimas. A ausência ou redução de impurezas no extrato enzimático contribui para o alto nível de atividade, que permite a utilização de pequenas quantidades da enzima.

As enzimas devem apresentar características cinéticas adequadas ao processo industrial no qual será aplicada. Portanto, considerando o grande potencial biotecnológico das lipases, a busca por novas enzimas com elevada termoestabilidade, especificidade por diferentes substratos, estabilidade a estocagem entre outras propriedades físico-químicas, bioquímicas e cinéticas, torna-se um importante campo de pesquisa.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo melhorar a produção, concentrar e caracterizar lipase de *Aspergillus niger* por fermentação no estado sólido (FES) utilizando resíduos agroindustriais como borras alcalinas e farelo de trigo, visando o conhecimento das suas propriedades a fim de possibilitar a indicação de uma aplicação industrial para esta enzima.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Produzir, concentrar e caracterizar uma lipase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação no estado sólido em colunas aeradas utilizando resíduos agroindustriais.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Produzir lipases de *A. niger* por fermentação no estado sólido e melhorar as condições de produção utilizando planejamento experimental;
- Estudar a influência de diferentes indutores na produção da enzima;
- Estudar o perfil cinético da produção de lipase, na condição de processo selecionada;
- Realizar a concentração enzimática, com a finalidade de obter uma lipase com maiores níveis de atividade;
- Caracterizar a lipase quanto a temperatura e pH ótimos, termoestabilidade, estabilidade ao pH e a estocagem e especificidade a diferentes óleos vegetais.

### 3 REVISAO DE LITERATURA

#### 3.1 Enzimas

As enzimas são proteínas, com exceção das ribozimas, especializadas em catalisar reações biológicas, atuando de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reação. Elas estão presentes em células animais, vegetais e microbianas, e são essenciais para os processos biológicos de todos os organismos vivos (BAILEY e OLLIS, 1986).

Os biocatalisadores são substâncias capazes de acelerar as reações bioquímicas, até torná-las instantâneas ou quase instantâneas ao diminuírem a energia de ativação. Além disso, as enzimas são capazes de atuar em pequenas quantidades, uma grande vantagem frente aos catalisadores químicos (NASCIMENTO et al., 2002).

As reações catalisadas por enzimas são  $10^{12}$  a  $10^{17}$  vezes mais rápidas do que as reações correspondentes não catalisadas (SUAN e SARDIMI, 2004; CASTRO et al., 2004). Segundo Coelho, Salgado e Ribeiro (2008), para apresentar atividade catalítica, algumas enzimas requerem a participação de moléculas menores de natureza não protéica, chamadas de cofatores, que são divididos em: metais e coenzimas. As lipases, por exemplo, não requerem essas moléculas, uma das características que as tornam bastante atrativas (TORRES et al., 2006).

As enzimas são biocatalisadores versáteis e com propriedades que as tornam indispensáveis na biotecnologia, principalmente por serem capazes de atuar em condições brandas de reação, sendo um atrativo no mercado industrial (MUSSATTO, FERNANDES e MILAGRES, 2007).

A expressão da atividade de uma enzima é medida através de sua velocidade de reação determinada em condições experimentais estabelecidas. Segundo Scriban (1985), esta atividade é função direta da estrutura terciária ou quaternária da molécula. Qualquer modificação que venha alterar a estrutura do sítio ativo da enzima implicará em alterações das propriedades catalíticas.

A velocidade da reação enzimática é influenciada por vários fatores: concentração da enzima, concentração de substrato, presença de inibidores e cofatores, temperatura e pH (MAGALHÃES, 2004).

Segundo a Enzyme Commission, uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 micromol de substrato ou a formação de 1 micromol de produto por minuto, nas condições de ensaio estabelecidas (temperatura, pH, concentração de substrato). Em muitas situações emprega-se a atividade específica, que é expressa em unidades (U) por massa de proteína (U/mg) (LIMA et al., 2001).

As enzimas são classificadas de acordo com as reações que catalisam. As lipases constituem um grupo específico de enzimas, classificadas internacionalmente pela Comissão de Enzimas como triacilglicerol acil hidrolases (E.C. 3.1.1.3), pois catalisam a hidrólise de triacilgliceróis na ligação éster-carboxílica, fornecendo glicerol e ácidos graxos livres (SAXENA et al., 2003a).

De acordo com a Enzyme Commission (EC) da International Union of Biochemistry (IUB), as enzimas foram divididas em seis grandes grupos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Classificação das enzimas de acordo com a IUB.

Número	Classe	Tipo de reação catalisada	Subclasse
1	Oxidoredutases	Reações de oxidação e redução de ligações do tipo C-H, C-C e C=C	Hidrogenases, oxidases, peroxidases, etc.
2	Transferases	Transferências de grupos aldeídico, cetônico, acila, fosforila ou metila	Transaldolases, transcetolases, etc.
3	Hidrolases	Hidrólise de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, anidridos e glicosídeos	Esterases, lipases, peptidases, fosfatases, etc.
4	Liasas	Adição-eliminação de grupos a dupla ligação ou formação de duplas ligações por remoção de grupos	Descarboxilases, cetoácidiolases, hidrolases
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros	Racemases, epimerases, etc.
6	Ligases	Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O e C-N e ésteres de fosfato	Sintetases

**Fonte:** (KIELING, 2002).

As enzimas podem ser de origem vegetal, animal ou microbiana. Dentre as enzimas de origem animal, tem importância a pancreatina; tripsina, renina e catalase, dentre as enzimas de origem vegetal, a papaína e bromelina (LIMA et al. 2001) e de origem microbiana as lipases, amilases e proteases são destaque no mercado industrial (MUSSATTO, FERNANDES e MILAGRES, 2007).

O mercado mundial de enzimas apresenta valor comercial de US\$ 2 bilhões de dólares anuais e vem crescendo a cada ano com taxas de 8 a 10%. A indústria de alimentos é a que mais tem se beneficiado com o uso das enzimas, sendo utilizadas em 15% dos processos industriais. Além disso, este setor está em crescente expansão faturando trilhões de dólares anuais (AQUINO, 2008).

A demanda mundial de enzimas tem crescido anualmente, sendo mais de 90 % do seu comércio efetuado pelos Estados Unidos, Europa e Japão. Existe uma expectativa de crescimento deste mercado, e espera-se para o ano de 2012, gastos superiores a 2,7 bilhões de dólares, com previsões futuras de aumento em torno de 4 % (IYER e ANANTHANARAYAN, 2008).

Cerca de 4.000 enzimas são conhecidas e destas, 200 são de uso comercial. A maior parte é de origem microbiana. Entretanto, apenas cerca de 2% dos microrganismos encontrados na natureza já foram testados como fontes de enzimas (HASAN; SHAH e HAMEED, 2006).

Cerca de 60% de toda produção mundial de enzimas é oriunda da Comunidade Européia (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001). Segundo Paques e Macedo (2006) as enzimas hidrolíticas: proteases, celulasas, amilases e lipases, são as mais utilizadas na química orgânica. As lipases são consideradas a terceira enzima mais vendida, perdendo apenas para as proteases e amilases (RIGO et al., 2010).

Cerca de 37% da produção de enzimas no mercado mundial é utilizado em detergentes, 12% em têxteis, 11% em amido, 8% em panificação, 6% em ração animal, que somam em torno de 75% das enzimas produzidas industrialmente, sendo que aproximadamente 10% do mercado total de enzimas são produzidas para o uso interno (COELHO, SALGADO e RIBEIRO, 2008).

Segundo Mussato, Fernandes e Milagres (2007) o mercado brasileiro de enzimas, possui grande potencial, devido principalmente à enorme geração de resíduos agroindustriais os quais podem ser utilizados para produção enzimática.

Entre as maiores empresas produtoras de enzimas estão a Amano Pharmaceuticals (Japão), Novozyme (Dinamarca), Genencor International (USA), Unilever (Holanda), Biocatalysts (Inglaterra) e Meito Sankyo (Japão) (KRISHNA, 2002).

Uma gama de enzimas estão disponíveis no mercado e são produzidas por diferentes espécies microbianas, como pode ser observado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Enzimas de diferentes espécies microbianas produzidas por fermentação no estado sólido.

Enzimas	Microrganismos	Substratos
Celulase, $\beta$ -glicosidases, CMCase, lacase, xilanase, poligalacturonase, lignase	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Lentinula</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bagaçõ, casca de coco, de arroz, de trigo, silagem, resíduo de mandioca
Xilanases, $\beta$ -xilosidases, $\alpha$ -arabinofuranosidase, acetoesterase, catecol oxidase	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Lentinula</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Casca de arroz, farelo de trigo, bagaçõ de beterraba, resíduo da indústria de café
Lacase, Li-peroxidase, Mn-peroxidase, aril-álcool oxidase, catalase, fenol oxidase	<i>Penicillium</i> sp., <i>Pleorotus</i> sp., <i>Panus tigrinus</i> , <i>Polyporus</i> sp.	Bagaçõs, farelo de trigo, serragem, pedúnculos de algodão, celulose, lascas de madeira
Proteases (ácidas, neutras e alcalinas)	<i>Aspergillus</i> sp., <i>penicillium</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp.	Farelo de trigo, farinha de soja, farelo de girassol
Lipases	<i>Candida</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp., <i>Neurospora sitophila</i>	Farelo de trigo, de arroz, torta residual de coco, de amendoim
$\alpha$ -gactosidase, $\beta$ -gactosidase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. fonscaeus</i> , <i>Rhizomucor</i>	Farelo de trigo, torta residual de soja
$\alpha$ -amilase, $\beta$ -amilase, glicoamilase	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Saccharomyces</i> sp.	Farelo de trigo, de arroz, torta residual de coco, resíduo de mandioca, batata, batata-doce
Glutaminase	<i>Vibrio costicola</i>	Farelo de trigo, serragem, torta residual de coco
Inulinase	<i>Staphylococcus</i> sp., <i>Kuyveromyces marxianus</i>	Raiz de chicória
Fitase	<i>Aspergillus ficuum</i> , <i>A. carbonarius</i>	Farelo de canola
Tanase	<i>Rhizopus oryzae</i>	Farelo de trigo + ácido tânico
Feruloil para-coumaroil esterase	<i>Penicillium pinophilum</i>	Palha de trigo

Fonte: (PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000).

### 3.2 Lipases

As lipases (hidrolases de triacilglicerol E.C 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações ésteres presentes nas moléculas de triacilgliceróis, liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Além da hidrólise, catalisam reações de esterificação, transesterificação e interesterificação de lipídios (JAEGER et al., 1993).

Ao contrário das esterases (EC 3.1.1.1, hidrolases de ésteres carboxílicos), as lipases são capazes de hidrolisar os ésteres de cadeia longa de ácidos graxos (GUNCHEVA e ZHIRYAKOVA, 2011). Além disso, as lipases apresentam a capacidade de atuar na interface óleo/água, já as esterases agem em ésteres solúveis em água (CARVALHO et al., 2003). Além das características citadas anteriormente, a especificidade da lipase é um fator crucial para destinar a sua aplicação. Segundo Jensen, Dejong e Clark (1983) a especificidade das lipases é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação enzima-substrato. As lipases podem ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), vegetal e microbiana (bactérias e fungos) (MARTINS et al., 2008). No que diz respeito a sua atuação sobre determinada região do triacilglicerol, as lipases microbianas podem ser classificadas em três grupos (CASTRO et al., 2004; CARVALHO et al., 2003).

(a) Lipases não específicas: não apresentam especificidade com relação à natureza do grupo acil ou à posição em que está esterificado. São enzimas que catalisam a hidrólise das moléculas de acilglicerol de forma aleatória. Exemplos: lipases produzidas por *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum* e *Pseudomonas* sp.

(b) Lipases 1,3 específicas: catalisam a liberação de ácidos graxos especificamente nas posições 1 e 3 dos triacilglicerol e formam produtos diferentes daqueles obtidos por lipases não regioselectivas. Exemplos: lipases de *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Penicillium roquefortii*, e *Mucor miehei*.

(c) Lipases ácido graxo específicas: catalisam a hidrólise de ésteres cujos ácidos graxos são de cadeia longa insaturada, contendo dupla ligação *cis* no carbono 9. Este tipo de especificidade não é comum entre as lipases e o exemplo mais estudado até hoje é a lipase de *Geotrichum candidum*. Dentre as lipases vegetais, as mais estudadas são as extraídas de cereais e óleos de sementes (PAQUES e MACEDO, 2006) e as de origem animal as mais utilizadas são aquelas extraídas do pâncreas de porco (FABER, 1997).

Dentre as fontes de lipases, as microbianas são as mais utilizadas industrialmente, principalmente porque as enzimas de microrganismos apresentam procedimentos mais simples de isolamento e maior possibilidade de manipulação genética (COLEN, JUNQUEIRA e MORAES-SANTOS, 2006), apresentam grande variedade de atividade catalítica e são mais estáveis que as lipases de outras fontes (JAYAPRAKASH e EBENEZER, 2010), não estão sujeitas às limitações de produção devido à sazonalidade, como pode ocorrer com as enzimas de origem vegetal; possuem rápido crescimento em meios relativamente de baixo custo (JOSEPH et al., 2007) e são mais suscetíveis à imobilização, quando comparadas a outras enzimas (ARAVINDAN et al., 2007).

As lipases microbianas podem ser constitutivas, que são aquelas produzidas pelos microrganismos independentemente da presença de algum tipo de indutor, e lipases induzíveis, as quais são estimuladas por indutores presentes no meio de cultivo (ROVEDA, HEMKEMEIER e COLLA, 2010). O uso de óleos vegetais tem sido apontado como a principal fonte de carbono indutora para a produção de lipase em fermentação no estado sólido (SILVA et al., 2005; DALMAU et al., 2000; COUTO e SANROMÁN, 2006). Além dos óleos vegetais, as borras e tortas, resíduos da indústria de óleos, também são consideradas

uma importante fonte de nutrientes para o crescimento de microrganismo, podendo ser utilizadas também como fonte indutora (DAMASO et al., 2008).

As lipases microbianas em geral são extracelulares, sendo excretadas através da membrana externa para o meio de cultura (TAN et al., 2003). As lipases extracelulares são produzidas por muitos microrganismos quando em condições favoráveis. Os fungos filamentosos são os melhores produtores de lipases, principalmente os pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor* e *Thermomyces* (CARDENAS et al., 2001).

Dentre as lipases bacterianas destacam-se aquelas produzidas por *Pseudomonas*, principalmente por apresentar produção extracelular (CASTIGLIONI, 2009) e dentre as leveduras, *Candida rugosa* tem sido a mais empregada em processos industriais (CIHANGIR e SARIKAYA, 2004; ELLAIAH et al., 2004).

As lipases encontram-se amplamente distribuídas na natureza e apresentam ampla faixa de atuação em pH, variando entre 3,0 a 11,0 (GUPTA et al., 2004). Podem apresentar peso molecular entre 20-75 KDa e faixa ótima de temperatura encontra-se entre 30°C e 40°C, entretanto, algumas lipases tem mostrado níveis de estabilidade consideráveis mesmo em temperaturas extremas, como 5°C e 70°C. Sua termoestabilidade pode variar consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as de melhor estabilidade (CASTRO et al., 2004).

Segundo Vecchia, Nascimento e Soldi (2004) um dos campos de pesquisa que podem solucionar os problemas enfrentados quanto à estabilidade enzimática, é o desenvolvimento de técnicas de imobilização, as quais visam minimizar os efeitos causados pelo seu uso em ambientes adversos, tais como solventes orgânicos, variações no pH e altas temperaturas.

Wang et al. (1995) isolaram *Bacillus* sp. de uma fonte térmica e verificaram que a lipase produzida por este microrganismo apresenta máxima atividade em pH 9,5 e que reteve 100% de atividade após 30 minutos à 75° C. Na literatura são reportados vários outros exemplos de lipases microbianas estáveis em temperaturas acima de 50°C, como as lipases de *B.circulans* (KADEMI et al., 2000); de *Arthrobacter* sp. (SHARMA, BARDHAN e PATEL, 2009); de *Thermus thermophilus* (DOMINGUEZ et al., 2005) e de *Burkholderia multivorans* (GUPTA et al., 2007).

Segundo Fuciños et al. (2005) um dos principais problemas enfrentados pelas indústrias consiste em encontrar enzimas que sejam estáveis a altas temperaturas e a drásticas condições de pH. As extremozimas e as enzimas termofílicas podem solucionar este problema, pois exercem função catalítica em condições extremas e são mais resistentes à desnaturação por proteólise e agentes químicos do que enzimas mesofílicas. As enzimas termofílicas tem se mostrado tolerantes a desnaturantes como detergentes e solventes orgânicos, portanto, são de grande interesse em reações de síntese orgânica (ATOMI, 2005).

Segundo Jaeger e Eggert (2002), milhares de microrganismos foram isolados do solo e avaliados quanto a sua capacidade de produzir lipases, sendo que 20% mostraram-se úteis em tal aplicação. As enzimas microbianas produzidas comercialmente são provenientes principalmente de bactérias e fungos (filamentosos e leveduras), sendo na sua maioria extracelulares, da classe das hidrolases.

Em 1994, a Novo Nordisk introduziu a primeira lipase comercial recombinante denominada “lipolase”, oriunda do fungo *Thermomyces lanuginosus* e expressa em *Aspergillus oryzae* (JAEGER e REETZ, 1998).

Atualmente as principais lipases comerciais são produzidas por diversas empresas e a partir de diferentes microrganismos, conforme ilustrado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Principais lipases comerciais produzidas por diferentes empresas.

Fonte Microbiana	Nome Comercial	Empresa Produtora	Aplicações	Setor industrial
<b>Bactérias</b>				
<i>Alcaligenes sp.</i>	Lipase PL	Meito Sangyo, Co.	Modificação de óleos e gorduras	Alimentos
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Lipase CV	Genzyme	Diagnósticos/análises	Saúde
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Lipase SL	Amano Genencor	Síntese quirál	Alimentos Produção de
<i>Pseudomonas menodocina</i>	Lumafast	International	Hidrólise de óleos e gorduras	detergentes
<b>Fungos</b>				
<i>Aspergillus niger</i>	Lipase DS	Amano	Suplemento dietético	Biofarmacêutico
	Lipase	Sigma	Síntese orgânica	Alimentos
	Lipopan F <sup>a</sup>	Novozyme	Fortalecimento de massas alimentícias	Alimentos
	Lipomod <sup>TM</sup> 627P-L627P	Biocatalysts	Melhoramento de massa e de vida de prateleira	Alimentos
<i>Rhizopus oryzae</i>	Lipomod <sup>TM</sup> 36P-L036P	Biocatalysts	Suplemento dietético Melhoramento do flavor de queijo cheddar	Biofarmacêutico
<i>Rhizomucor miehei</i>	Palatase <sup>a</sup>	Novozyme		Alimentos/laticíneos
<b>Leveduras</b>				
<i>Candida cylindracea</i>	Lipase MY	Meito Sangyo, Co.	Suplemento dietético Hidrólise dos componentes hidrofóbicos da madeira (pitch)	Biofarmacêutico Produtos Florestais
	Resinase <sup>a</sup>	Novozyme		
	Novozym 435 <sup>a</sup>	Novozyme	Produtos a base de óleo	Alimentos
<i>Candida antarctica</i>	Noopazyme <sup>a</sup>	Novozyme	Massas/macarrão	Alimentos
<i>Candida cylindracea</i> /porção pancreática	Lipomod <sup>TM</sup> 29P-L029P	Biocatalysts	Sabor tipo cheddar	ts/Alimentos/Laticíneos

<sup>a</sup> nomes comerciais de lipases recombinantes.

Fonte: adaptado de Salihu et al., 2012.

### 3.3 Reações Catalisadas por Lipases

Segundo Castro et al. (2005) a maioria das reações orgânicas podem ser realizadas utilizando catalisadores químicos ou biocatalisadores. Uma das grandes vantagens do uso dos biocatalisadores frente aos catalisadores químicos é a redução de tempo, redução de gasto de energia e redução do impacto ambiental.

Entre os processos bioquímicos de maior interesse industrial estão as reações catalisadas pelas lipases, as quais representam aproximadamente 20% das biotransformações realizadas atualmente (JAYAPRAKASH e EBENEZER, 2010). As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica porque não requerem cofatores, atuam em uma ampla faixa de pH, são muito estáveis nesse meio, apresentam especificidade, regiosseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade (TORRES et al., 2006).

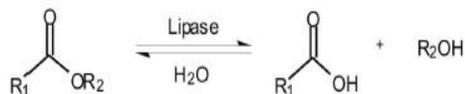
A quimiosseletividade refere-se à capacidade de atuar sobre um determinado grupamento químico; a regiosseletividade refere-se à capacidade da enzima em distinguir grupos funcionais que estão situados em diferentes regiões da mesma molécula do substrato e a enantiosseletividade refere-se à capacidade da enzima em reconhecer qualquer tipo de quiralidade presente na molécula do substrato (CARLI, 2006). As principais reações catalisadas pelas lipases, além da hidrólise são: esterificação, interesterificação, alcoólise, acidólise e aminólise (GHANEM, 2007).

O deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto (hidrólise) ou inverso (esterificação), é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional (NASCIMENTO, DALLA-VECCHIA e SOLDI, 2004).

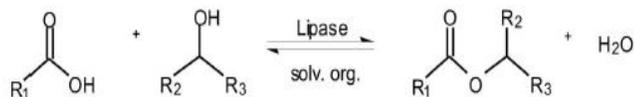
Segundo Castro et al. (2004) os principais produtos obtidos por esterificação são: isopropilmiristato, isopropilpalmitato e 2-etilexilpalmitato, os quais são comumente empregados no setor farmacêutico, como, por exemplo, em formulação de cosméticos e outros produtos de higiene. Os ésteres de carboidratos, também são obtidos em reações de esterificação e são empregados na produção de aromas (THAKAR e MADAMWAR, 2005) e de óleos essenciais (YADAV e LATHI, 2004).

A reação de transesterificação refere-se à troca de radicais acil entre um éster e um ácido (acidólise), um éster e um álcool (alcoólise), um éster e outro éster, na forma de glicerídeos ou de mono-éster (interesterificação) e a reação de aminólise, síntese de amidas (CARVALHO, et al., 2003). A Figura 1 ilustra as principais reações catalisadas por lipases.

1. Hidrólise (meio aquoso)

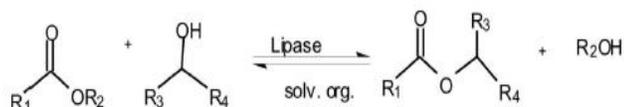


2. Esterificação (meio orgânico)

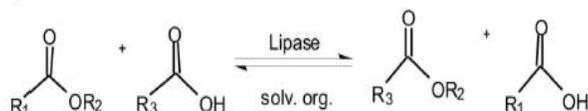


3. Transesterificação

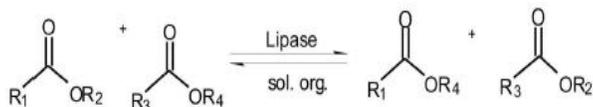
a) Alcólise



b) Acidólise



4. Interesterificação



**Figura 1.** Principais reações catalisadas por lipases

Fonte: (GHANEM, 2007).

As reações de interesterificação são empregadas principalmente em processos que visam à obtenção de lipídeos estruturados e as reações de transesterificação são comumente empregadas para a produção de biodiesel (HANSAN, SHAH e HAMEED, 2006).

A interesterificação é um processo utilizado na obtenção de óleos e gorduras com propriedades nutricionais, funcionais e físicas desejáveis, devido a um rearranjo ou modificação de ácidos graxos nas moléculas de triacilgliceróis (ISEO, 2006).

Segundo Baron (2003) os principais substratos das lipases são os triacilgliceróis, além de atuarem sobre uma gama de substratos não-naturais (ésteres não-lipídicos) de diversos tamanhos (BARON, 2003). Em geral, a maior atividade catalítica de lipases ocorre na interface água/lipídeo, através do fenômeno chamado de ativação interfacial e tanto a qualidade quanto a área interfacial têm papel importante na atividade catalítica dessas enzimas (BALCÃO, PAIVA e MALCATA, 1996).

### 3.4 Aplicações Biotecnológicas das Lipases

As lipases possuem inúmeras aplicações industriais, principalmente, por apresentarem ampla faixa de atuação em pH, 3 a 11, e temperatura, de 30 a 60°C (GUPTA et al., 2004). Além disso, características como a estabilidade a solventes orgânicos, não exigência de cofatores e especificidade ao substrato, tornam essas enzimas bastante atrativas para o setor

de biotecnologia (ROH e VILLATTE, 2008). No entanto, muitas vezes, os altos custos de produção destes biocatalisadores restringem sua utilização (FREIRE e CASTILHO, 2000).

As lipases podem ser utilizadas na modificação de óleos e gorduras (MATSUOKA et al., 2009), na formulação de detergentes (LIU et al., 2008), na indústria farmacêutica (VIEIRA et al., 2009), no setor alimentício (GANDRA et al., 2008), na produção de biodiesel (RANGANATHAN, NARASIMHAN e MUTHUKUMAR, 2008), nos curtumes, no tratamento de efluentes, dentre outras aplicações (SALIHU et al., 2012). Essas enzimas vem conquistando o mercado global, sendo as indústrias que fabricam detergentes para lavagem de roupas o principal setor que faz uso de lipases (HASAN; SHAH e HAMEED, 2006).

### 3.4.1 Indústria alimentícia

As lipases são empregadas em diversos campos da tecnologia de alimentos e são utilizadas, principalmente, com a finalidade de aprimorar o aroma e a textura dos mesmos. Estas enzimas são utilizadas na hidrólise da gordura do leite; na intensificação do sabor dos queijos e na aceleração do processo de maturação, contribuindo para o desenvolvimento de aromas e sabores nesses produtos (SAXENA et al., 1999).

Uma das principais aplicações das lipases no setor de laticínios é na manufatura de queijos duros, como provolone. O sabor característico desse produto é devido aos ácidos graxos de cadeias curtas produzidos pela ação das lipases presente no coalho de bezerro. No processo de maturação, no qual ocorrem as reações responsáveis pelo realce do sabor e textura, existe interesse em acelerar o processo, que geralmente é lento. Dessa forma, a adição de lipases e peptidases na etapa de maturação dos queijos, torna-se interessante (BON, FERRARA e CORVO, 2008).

Na panificação, a adição de lipases a massas de pães e bolos tem a finalidade de aumentar o volume do pão, melhorar a textura e o aroma, além de retardar a sinerese, aumentando a vida de prateleira do produto (GANDHI, 1997).

Gandra et al. (2008) estudaram a aplicação da enzima lipase e do emulsificante monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras, visando a melhoria das características do produto, tais como textura e aumento da vida de prateleira. Os autores concluíram que nas condições em que os ensaios foram conduzidos e para as faixas de lipase (0 a 50 ppm) e monoglicerídeo (0 a 2%) estudadas, verificou-se a possibilidade de substituição do emulsificante pela enzima em formulação de pão de forma enriquecido com fibras.

Lipases de *Rhizomucor miehei* foram empregadas para acelerar o processo de maturação de salsichas fermentadas e contribuir para o desenvolvimento de sabor (RATHI, SAXENA e GUPTA, 2001).

Lipases também são utilizadas na remoção de gordura em carnes e pescados e na melhoria do aroma de produtos embutidos (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001).

Segundo Watanabe et al. (2004) as lipases podem ser empregadas na produção de emulsificantes, como monoacilgliceróis contendo ácido linoléico.

As reações de hidrogenação, hidrólise e interesterificação promovem a alteração da composição básica dos óleos e gorduras, visando a obtenção de lipídeos estruturados, que são obtidos através da modificação e/ou substituição de um ou mais ácidos graxos na molécula de triacilglicerol, dando origem a lipídeos que apresentam propriedades nutricionais, funcionais e físicas diferentes dos óleos e gorduras originais (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001).

Métodos químicos convencionais para transformação de óleos e gorduras envolvem a produção de triacilglicerol na presença de catalisadores ácidos ou básicos. No entanto, o ácido leva à formação de subprodutos indesejáveis que podem ser difíceis de serem separados do

produto final. As lipases surgem então, como uma excelente perspectiva para produção de óleos e gorduras com maior valor agregado (OLIVEIRA et al., 2004).

Uma das principais aplicações da lipase em processos de interesterificação de óleos e gorduras é o aproveitamento de óleos de baixo custo visando à obtenção de substitutos da manteiga de cacau (UNDURRAGA, MARKOVITS e ERAZO, 2001).

Os substitutos da manteiga de cacau geralmente são produtos derivados da hidrogenação e/ou fracionamento de óleos vegetais, principalmente dos óleos de coco, palmiste, dendê e soja, e de algumas gorduras não vegetais como óleo de peixe ou sebo comestível. Os principais substitutos são também conhecidos como Cocoa butter substitut (CBS) e Cocoa butter equivalent (CBE) (MINIM, CECCHI e MINIM, 1999).

Geralmente os produtos de chocolate contêm 30% de manteiga de cacau, e devido ao alto custo do cacau e seus derivados, o setor alimentício vem buscando soluções mais econômicas para a substituição total ou parcial da manteiga de cacau nesses produtos, dessa forma, lipases específicas podem ser empregadas na modificação de óleos visando à obtenção de substitutos da manteiga de cacau (UNDURRAGA, MARKOVITS e ERAZO, 2001).

Na Tabela 4 podem ser observadas de forma sintetizada as principais aplicações das lipases no setor alimentício.

**Tabela 4.** Principais aplicações das lipases no setor alimentício.

Setor	Área	Aplicação	Produto
Alimentício	Laticínio	Hidrólise da gordura do leite	Agente aromatizante para produtos lácteos
	Panificação	Melhoramento do sabor e/ou qualidade, prolongamento do tempo de prateleira	Confeitos e bolos
	Bebidas	Melhoramento do aroma e aceleração da fermentação, por remoção de lipídeos	Bebidas alcoólicas (vinho e outras)
	Processamento de derivados do ovo	Melhoramento da qualidade do ovo por hidrólise dos lipídeos	Maionese, molhos e cremes
	Processamento de carne e peixe	Desenvolvimento de aromas e remoção de excesso de gorduras	Produtos embutidos
	Processamento de óleos	Transesterificação de óleos naturais; hidrólise de óleos (ácidos graxos), diacilglicerol	Óleos e gorduras modificadas (substitutos da manteiga de cacau)

Fonte: adaptada de Castro et al. (2004).

### 3.4.2 Indústrias de detergentes

A utilização de enzimas nas formulações de detergentes iniciou-se em 1914, ano em que foi produzido o primeiro detergente em pastilhas que utilizava proteases de pâncreas de porco. Porém, somente nos anos 60 que a aplicação dessas enzimas passou a ser efetiva (COELHO, SALGADO e RIBEIRO, 2008). O maior segmento de aplicação de enzimas industriais, principalmente das lipases, é o setor de fabricação de detergentes para uso domiciliar (HASAN; SHAH e HAMEED, 2006). Neste tipo de produto, a principal função

das enzimas é a remoção de manchas. Muitos detergentes atuais são caracterizados por formulações de multi-enzimas. O efeito combinado de proteases, amilases, lipases e celulases resulta em uma limpeza sinérgica e possibilita a manutenção das cores do tecido (NOVOZYMES, 2008).

Segundo Sharma, Christi e Banerjee (2001), o emprego de lipases nesse setor é responsável pela venda de cerca de 1.000 toneladas de lipases por ano. Devido a habilidade em hidrolisar gorduras, as lipases são utilizadas para facilitar o rompimento de ligações presentes nos triacilgliceróis e, conseqüentemente solubilizar gorduras aderidas ao tecido. As principais características necessárias a esta finalidade são: ter baixa especificidade em relação ao substrato, pois isto possibilita a hidrólise de gorduras distintas; estabilidade nas condições severas de lavagem (pH 10-11, 30 - 60°C); habilidade de resistir a presença de componentes da formulação, como por exemplo: surfactantes e proteases, que são ingredientes importantes na formulação de detergentes (CARDENAS et al., 2001).

Várias enzimas comerciais são aplicadas neste setor, são elas: Lipolase® (Novozymes), obtida do fungo *Thermomyces lanuginosa* e expressa em *A. oryzae*; a Lumafast® (Genencor, USA) e a Lipomax® (Gist-Brocades, Holanda), lipases bacterianas oriundas de *Pseudomonas mendocina* e *Pseudomonas. alcaligenes* (JAEGER e REETZ, 1998).

### 3.4.3 Curtumes

Nas indústrias de fabricação de couro são comumente utilizadas proteases e lipases. Essas enzimas têm sido utilizadas principalmente na etapa de desengraxe como alternativa aos tensoativos e solventes, não interferindo na estrutura do produto final apenas hidrolisando a gordura. (COELHO, SALGADO e RIBEIRO, 2008).

Os couros crus e peles contêm grandes quantidades de proteínas e gorduras, e antes que as peças sejam curtidas, essas substâncias devem ser removidas. A remoção da carne, sangue, pelos e gordura garante um produto de melhor qualidade (GANDHI, 1997).

A utilização das lipases apresenta vantagens já que estas não interferem na estrutura do produto final

A utilização de enzimas em curtumes contribui para a redução do consumo de água durante o processo inicial de limpeza das peles, substitui o uso de produtos químicos agressivos, tornando o processo industrial mais seguro para os técnicos, mais rápido, mais eficiente e ambientalmente correto (NOVOZYMES, 2008).

O processamento do couro envolve a remoção de gordura subcutânea e de pelos através de etapas de lavagem e de retirada dos pelos em vários banhos, com níveis de pH na faixa de 8 a 13 e possivelmente na presença de surfactantes e sequestrantes. O uso de um preparado enzimático contendo lipases e outras enzimas, tais como proteases, pode melhorar o processamento do couro (PANDEY et al., 1999).

### 3.4.4 Tratamento de efluentes

Na literatura tem sido relatado o uso de enzimas no tratamento de efluentes dos mais diversos tipos: contaminantes fenólicos, pesticidas, surfactantes, metais pesados, resíduos da indústria de celulose e papel, resíduos da agroindústria, assim como na desidratação de lodos, na bioconversão de cascas de crustáceos e na degradação de pectina (JORDAN e MULLEN, 2007; KARAM e NICELL, 1997).

As lipases podem ser empregadas no tratamento de efluentes com alto teor de gorduras como os gerados pela indústria de carnes, laticínios e de óleos. Essas enzimas tem sido utilizadas na remoção de gorduras de aeradores de estações de tratamento que empregam lodo

ativado. A camada de gordura impede a transferência de oxigênio, comprometendo a reposição de oxigênio necessário à biomassa na degradação da matéria orgânica (MENDES et al., 2005).

Pereira, Castro e Furigo (2003) utilizaram lipase microbiana de *Candida rugosa* para tratar efluentes gerados em frigoríficos avícolas. As maiores porcentagens de hidrólise foram alcançadas em efluentes tamponados em pH 7,0.

A utilização de enzimas para o tratamento de resíduos gerados pelas indústrias em substituição ao uso de agentes químicos contribui para a preservação do meio ambiente, pois reduz a presença de produtos residuais que agridem e poluem os rios e o solo.

### 3.4.5 Produção de biodiesel

As lipases também têm sido testadas na produção de biodiesel por transesterificação a partir de diferentes óleos vegetais e metanol ou etanol (NOUREDDINI, GAO e PHILKANA, 2005; OLIVEIRA et al., 2004).

O biodiesel é um monoalquil éster de ácidos graxos, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais ou gordura animal, cuja utilização está associada à substituição parcial ou integral dos combustíveis fósseis, como, por exemplo, o diesel. O biodiesel apresenta baixa toxidez, é isento de compostos aromáticos e possui propriedades semelhantes ao diesel comum, além de baixo risco de explosão e ação como ótimo lubrificante (COSTA NETO, 2000).

A produção de biodiesel pode ser gerada por diversos processos, tais como pirólise, emulsificação ou transesterificação, sendo este último o mais utilizado por apresentar fatores técnicos e econômicos mais atrativos (CANDEIA et al., 2006).

Para a produção de biodiesel por transesterificação, é necessária a presença de um catalisador, que pode ser ácido, básico ou enzimático, geralmente em processos químicos, a escolha é pelo catalisador básico, por ser mais rápido. Segundo Knothe et al. (2006), o metanol é o álcool mais utilizado para a produção industrial de biodiesel por ser mais barato, apesar de sua substituição por etanol estar sendo estudada, principalmente pelo fato de ser menos tóxico que o metanol, por ser oriundo de biomassa e ser produzido em grandes quantidades no Brasil.

A aplicação de lipase para produção de biodiesel a partir de óleos vegetais tem atraído a atenção das indústrias e pesquisadores, pois estas enzimas possui a capacidade de esterificar ácidos graxos livres, o glicerol é facilmente recuperado, menor demanda de energia e menor quantidade de efluentes gerados. Os principais óleos vegetais empregados para a produção de biodiesel são: soja, milho, amendoim, algodão, babaçu e palma (RANGANATHAN, NARASIMHAN e MUTHUKUMAR, 2008).

Hernández-Martín e Otero (2008) estudaram a síntese enzimática do biodiesel via alcoólise para distintos óleos vegetais: girassol, oliva, soja e borragem. Os autores utilizaram duas lipases comerciais: (Novozym® 435) e Lipozyme® TL IM. As duas lipases converteram após 48 horas (Novozym® 435) e 96 horas (Lipozyme® TL IM), 84% da reação para éster etílico. Os autores optaram pela enzima Novozym® 435, uma vez que após nove ciclos num reator tipo batelada (25 °C), a lipase ainda apresentava 85 % da atividade inicial.

Chen, Du e Liu (2008), produziram biodiesel utilizando 2 lipases dos microrganismos geneticamente modificados *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* e observaram que a concentração da enzima, temperatura da reação, razão molar metanol/resíduo de óleo ácido e velocidade de agitação foram as variáveis mais significativas na produção de biodiesel. A previsão da produção de biodiesel foi de 0,915 (m/m), sob as condições ideais.

### 3.4.6 Indústria farmacêutica

As características de enantioselectividade e enantioespecificidade das lipases permitem a obtenção de produtos opticamente puros, como, por exemplo, a síntese de drogas enancio-puras, o que é extremamente vantajoso, já que em muitos casos, normalmente, apenas um dos enantiômeros apresenta atividade terapêutica (GULTEKIN et al., 2004).

Adicionalmente, as lipases vem sendo empregadas na produção de antidepressivos, anti-hipertensivos, vasodilatadores e drogas antiasmáticas (FREIRE e CASTILHO, 2000; BEVILAQUA et al., 2005); na produção de cosméticos, perfumaria, produção de aromas, surfactantes ou de emolientes usados em cremes para a pele e cremes bronzeadores (SAXENA et al., 1999; SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001).

### 3.4.7 Outras aplicações

Vários outros campos de atividade tem utilizado lipases, como, por exemplo, na indústria de papel e celulose para a remoção do “*pitch*”, que são componentes hidrofóbicos da madeira, como triacilgliceróis e ceras, que são indesejáveis na manufatura de papel (NGUYEN et al., 2008). Além disso, elas podem reduzir drasticamente a quantidade de cloro necessária para o branqueamento do papel. Podem ainda encontrar aplicação na limpeza de sistemas de membranas (MAARTENS, SWART e JACOB, 1996), na produção de poliésteres orgânicos e aromáticos (LINKO et al., 1998), entre outras aplicações.

## 3.5 Processos Fermentativos para a Produção de Lipases

Para a produção de enzimas microbianas são aplicados dois tipos de fermentação: fermentação submersa (FS) e fermentação no estado sólido (FES). Na FES, o microrganismo cresce na superfície das partículas sólidas na ausência ou redução de água livre, entretanto, o meio deve conter umidade suficiente para permitir o crescimento e o metabolismo dos microrganismos (SCHMIDELL et al., 2001).

A fermentação submersa é aquela que tem como característica principal a utilização de um meio fermentativo líquido, normalmente, com nutrientes solúveis. Dessa forma, os microrganismos consomem o substrato do meio e secretam metabólitos, como, por exemplo, as enzimas (MITCHELL et al., 2006).

A eficiência dos processos fermentativos seja em FS ou FES depende de vários fatores, a saber: pH, temperatura, aeração, tipo de substrato e umidade. Esta última é um fator crítico na viabilidade do processo, pois o aumento ou diminuição do conteúdo de água no meio pode afetar o crescimento do microrganismo e, conseqüentemente, a produção de metabólitos (SINGHANIA et al., 2009). Além disso, a concentração de inóculo, fontes de carbono e de nitrogênio, presença de indutores e inibidores, são fatores que influenciam na síntese destas enzimas (DOMINGUEZ et al., 2003).

Em ambas as técnicas de fermentação, o meio de cultivo utilizado deve atender à demanda nutricional do microrganismo produtor, aos objetivos do processo e à escala de operação. Para a seleção do meio de cultivo é avaliado principalmente o custo das matérias-primas a serem utilizadas, a disponibilidade e as características dos seus componentes (LIMA et al., 2001).

Segundo Schmidell et al. (2001) os meios de cultivo são divididos em sintéticos e naturais. Os sintéticos apresentam composição química bem definida e os naturais apresentam composição química complexa, geralmente desconhecida, porém geralmente preferidos por

apresentar custo reduzido. Os dois métodos fermentativos (FES e FS) apresentam vantagens e desvantagens.

### 3.5.1 Características gerais da FES

A fermentação no estado sólido apresenta como vantagens o baixo custo e simplicidade das matérias-primas empregadas como meio de cultivo durante a fermentação, menor probabilidade de contaminação, devido a menor quantidade de água presente no meio e a possibilidade de obtenção da enzima extracelular mais concentrada (PANDEY, 2003). Outra questão interessante é a alta produtividade obtida com esta técnica (COUTO e SANROMÁN, 2006).

Os biorreatores mais comumente utilizados em FES são do tipo bandeja, tambor rotatório, reatores de leito fixo e de leito fluidizado (ROBINSON e NIGAM, 2003; BIANCHI, MORAES e CAPALBO, 2001) e em colunas de vidro aeradas (SANTOS, 2012; DAMASO et al., 2008; COURI et al., 2000).

Apesar de inúmeras vantagens apresentadas pela FES, existem também algumas desvantagens, a saber: é um processo restrito a microrganismos capazes de crescer em ambientes com baixa atividade de água, embora já existam relatos sobre a aplicação de bactérias nos processos de FES; dificuldades no “scale-up” e no controle de parâmetros relacionados à transferência de massa e de calor (PANDEY, 2003). Devido a essas dificuldades apresentadas, alguns autores tentam solucionar ou minimizar tais problemas, desenvolvendo biorreatores mais adequados para o processo.

O ambiente fornecido seja por FES ou FS irá influenciar a adaptação do microrganismo ao meio de cultura. A produção de enzimas em FES favorece o crescimento de fungos que são microrganismos mais resistentes em ambientes com baixa atividade de água quando comparados com bactérias e leveduras (COUTO e SANROMÁN, 2006). Além disso, o crescimento das hifas confere ao fungo maior habilidade de penetração via sistema mecânico e enzimático, conseqüentemente, absorvendo maior quantidade de nutrientes presentes no meio (MITCHELL, BEROVIC e KRIEGER, 2002). No entanto, algumas bactérias tem sido reportadas em processos de fermentação no estado sólido (MAHANTA, GUPTA e KHARE, 2008; BRADDOO et al., 2002).

Segundo Couto e Sanromán (2006), a comparação dos processos fermentativos para a produção de lipases por FES e FS, investigada por vários autores, mostrou que a FES apresenta maiores rendimentos e estabilidade em relação à submersa. Entretanto, apesar da FES apresentar várias vantagens, ainda é pouco aplicada industrialmente para produção de enzimas, principalmente pela falta de tecnologias de biorreatores, poucos dados sobre a cinética microbiana e formação do produto (WANG e YANG, 2007).

A FES vem sendo utilizada com diferentes finalidades, tais como produção de enzimas, aromas, produtos bioativos, biopesticidas, ácidos orgânicos e alimentos fermentados, assim como para a biorremediação e biodegradação de compostos e destoxificação biológica de resíduos agroindustriais (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003; PANDEY et al., 2000).

Nas últimas décadas, atenção especial vem sendo dada para o reaproveitamento de resíduos e/ou coprodutos da agroindústria. Considerando que o Brasil é um país com abundância em matérias-primas agroindustriais, torna-se interessante aproveitá-las em bioprocessos, sendo que os principais coprodutos utilizados na produção de lipases através de fermentação no estado sólido são os óleos vegetais: babaçu, girassol, oliva, soja, palma, canola, milho (SILVA et al., 2005); farelo de trigo (DUTRA et al., 2008; SUN, XU e WANG, 2009) e farelo de soja (COLLA et al., 2010; VARDANEGA et al., 2010; GRIEBELER et al., 2011; GARLAPATI e BANERJEE, 2010).

Vários coprodutos e/ou resíduos como tortas (GODOY et al., 2011) e borras alcalinas (SANTOS, 2012) tem sido reportados na literatura, como suporte e/ou indutores para a produção em estado sólido de lipases, como por exemplo: bagaço de cana de açúcar (DIAZ et al., 2006); torta de mamona, torta de babaçu, casca de abacate e borra de café (DANTAS e AQUINO, 2010); torta de pinhão manso (MAHANTA, GUPTA e KHARE, 2008); farelo de soja (GRIEBELER et al., 2011); farelo de trigo (CONTESINI et al., 2009); torta do óleo de gergelim (MALA et al., 2007); farelo de arroz (ELLAIAH et al., 2004); farelo de cevada (DOMINGUEZ et al., 2003) e borra alcalina de milho (DAMASO et al., 2008).

A borra é o principal subproduto gerado pelas indústrias de refino de óleos comestíveis durante a etapa de neutralização alcalina do óleo. Os sabões são formados durante o primeiro refino do óleo bruto através da reação de neutralização para extração dos ácidos graxos livres com hidróxido de sódio. Esses sabões e a maioria dos materiais não oleosos são separados do óleo por centrifugação e denominados de borra alcalina (DOWD, 1998).

A borra é constituída por sais de sódio, ácidos graxos e outras substâncias como água, triacilgliceróis, fosfolipídeos, matéria insaponificável, produtos de degradação e outros materiais não oleosos incorporados ao sabão (FRÉ, 2009).

Segundo Salihu et al., (2012) o conteúdo de óleo residual presente nas borras, pode servir como indutor para a produção de lipases. Dessa forma, a fermentação no estado sólido (FES) aparece como uma tecnologia promissora para produção de enzimas, pois além de usar substratos de baixo custo, como por exemplo, resíduos agroindustriais, o biocatalisador pode ser produzido de forma mais concentrada, o que pode facilitar a sua recuperação do meio de cultura (MITCHELL et al., 2006).

Os substratos que compõem os meios devem conter fontes de energia, fontes de nitrogênio, substâncias minerais e fatores de crescimento como vitamina B, aminoácidos, nucleotídeos e ácidos graxos (LIMA et al., 2001). Em se tratando de FES, um outro fator importante é o tamanho das partículas sólidas. Partículas pequenas favorecem a compactação do sólido e poderão dificultar a difusão de gases no meio. Em contrapartida, partículas grandes favorecem a aeração, mas limitam a superfície de contato. Portanto, o tamanho ideal da partícula deve representar a acessibilidade dos nutrientes e a disponibilidade de oxigênio (PANDEY et al., 1999; MITCHELL et al., 2006).

Kamini et al. (1998) utilizaram diferentes resíduos para a produção de lipases de *Arpergillus niger* em FES. As maiores atividades lipásicas obtidas foram de 363 U/gms em 72 horas quando utilizou-se torta de óleo de gengibre e de 303 U/gms em 96 horas de fermentação fazendo uso de farelo de trigo como substrato. Neste estudo, a adição de fontes de nitrogênio e de indutores foram ineficazes para o aumento da produção da enzima.

Santos (2012) estudou a produção de lipase de *A. niger* mutante em FES empregando resíduos da indústria de refino de óleo, como a borra de milho, de girassol e de canola, além da ausência de borra. Resultados satisfatórios foram obtidos na ausência de indutor (182,35 U/g<sub>ms</sub>), entretanto, quando comparado com a presença de 3,0% de borra de girassol a atividade lipásica foi significativamente maior ( $p < 0,1$ ). A maior atividade foi de (201,81 U/g<sub>ms</sub>) nas seguintes condições: 0,5% de nitrogênio presente em 80 mL de solução de sulfato de amônio,  $10^8$  esporos/g<sub>m</sub> e 3,0% de borra de girassol.

Domínguez et al. (2003) investigaram a produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* por fermentação no estado sólido. Resultados obtidos revelaram que a utilização de nozes trituradas como substrato gerou cerca de 69 U/gms de atividade em 10 dias de fermentação, superando os resultados obtidos com farelo de cevada, suplementado com óleo de girassol, milho e oliva. Os autores concluíram que o uso de materiais orgânicos como suporte para a produção de lipases além de diminuir os custos de produção da enzima proporcionou maiores atividades quando comparado ao uso de suportes sintéticos.

A FES vem corroborar com a sustentabilidade ambiental na utilização de resíduos agroindustriais, além de agregar valor aos mesmos. Na Tabela 5 estão apresentados resultados de produção de lipase em FES utilizando-se diferentes microrganismos e resíduos.

**Tabela 5.** Estudos da produção de lipase em FES utilizando resíduos agroindustriais e diferentes microrganismos.

Microrganismos	Resíduos agroindustriais	Tempo de fermentação (horas)	Atividade lipásica máxima	Produtividade (U/gms.h)	Referências
<i>A. niger</i> mutante	Borra de girassol	72	201,81 U/gms	2,8	Santos (2012)
<i>A. niger</i> mutante	Farelo de trigo e óleo de mamona	96	23,7 U/mL	0,24	Dutra et al. (2008)
<i>A. niger</i> mutante	Farelo de trigo e borra de milho	48	62,7U/gms	1,3	Damaso et al. (2008)
<i>A. niger</i>	Torta de babaçu	96	24,6U/gms	0,25	Dantas e Aquino (2010)
<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	96	33.03 U/mL	0,34	Contesini et al. (2009)
<i>A. niger</i>	Bolo de óleo de coco, farelo de trigo e trigo rawa (WR)	96	628,7 U/gms	6,5	Edwinoliver et al. (2010)
<i>Aspergillus sp</i>	Farelo de soja	96	25,07 U	0,26	Colla et al. (2010)
<i>A. fumigatus</i>	Óleo de soja	120	119,46 U/gms	0,99	Martins et al. (2008)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Bagaço de cana e farelo de trigo	168	9,3 U/gms	0,05	Babu e Rao (2007)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Torta de semente de pinhão manso	120	1084 U/gms	9,03	Mahanta, Gupta e Khare (2008)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Farelo de trigo, enriquecido com 5% de óleo de milho.	72	108 U/gms	1,5	Fernandes et al. (2007)
<i>P. simplicissimum</i>	Torta de soja	100	21 U/gms	0,21	Di Luccio et al. (2004)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Torta de mamona	96	155.8 U/g	1,62	Godoy et al. (2011)
<i>Penicillium sp.</i>	Farelo de soja	48	186 U/g	3,87	Vardanega et al. (2010)
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Torta de babaçu	96	98.78 U/g	1,02	Silva et al. (2011)
<i>Penicillium sp.</i>	Farelo de soja	48	19,2 U/g	0,4	Griebeler et al. (2011)
<i>Rhizopus chinensis</i>	Farelo de trigo	72	24 U/g	0,3	Sun, Xu e Wang (2009)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Farelo de soja	120	96.52 U/g	0,8	Garlapati e Banerjee (2010)

\*U/gms: unidade de atividade lipásica por grama de meio seco

U/g: unidade de atividade lipásica por grama de meio

U/gms.h: unidade de atividade lipásica por grama de meio seco por hora

U/mL: unidade de atividade lipásica por mililitro de meio

### 3.5.2 Características gerais da fermentação submersa (FS)

Na fermentação submersa o crescimento microbiano ocorre em meio líquido (SCHMIDELL et al., 2001). Este tipo de fermentação geralmente é conduzido em fermentadores equipados com agitadores, dispositivos de aeração, camisas e serpentinas para o controle da temperatura (LIMA et al., 2001).

A FS é amplamente utilizada em escala industrial para a produção de enzimas e apresenta algumas vantagens frente a FES: melhor controle de processo, como temperatura e pH, melhor transferência de massa e meios de cultura mais homogêneos (COLLA et al., 2010). Segundo Graminha et al. (2008) quanto maior a homogeneidade do meio de cultura, mais precisos são os resultados.

Apesar da FS ser mais utilizada industrialmente para a produção de enzimas, apresenta algumas desvantagens, como por exemplo: maior dificuldade operacional em relação a transferência de oxigênio para os microrganismos, devido à baixa solubilidade do oxigênio em água (DURAND, 2003), investimento elevado, maiores custos com aeração e agitação (BON, FERRARA e CORVO, 2008) e geração de grande volume de efluentes (BALAJI e EBENEZER, 2008).

Freire et al. (1997) estudaram a produção de lipase e protease em fermentação submersa por uma cepa de *Penicillium restrictum*. Empregaram o meio de cultura com a seguinte composição (%; p/v): óleo de oliva (1,0); peptona (2,0); NaCl (0,5); extrato de levedura (0,1). O pH inicial foi de 5,5 e a incubação foi de 30° C, com agitação de 250 rpm. A atividade lipolítica máxima foi observada após 80 h de cultivo e coincidiu com a exaustão da fonte de carbono. Os autores observaram início de lise celular a partir de 75 h e aumento da concentração de protease no caldo fermentado em paralelo. O pH aumentou até 8,0 com 90 h ocorrendo também neste tempo queda da atividade lipolítica, como conseqüência provável de inativação da enzima ou sua proteólise, ou mesmo devido a ação conjunta dos dois fatores.

Estudos foram realizados por Tan et al. (2004) para a otimização das condições de cultivo de *Penicillium camembertii* por fermentação submersa em frascos agitados visando a produção de lipase. A melhor formulação do meio de cultura, após a avaliação de fontes de nitrogênio, fontes de carbono e sais minerais diversos foi (em %; p/v): farelo de soja desengordurado (4,0); óleo de jojoba (0,5); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1); Tween 60 (0,1). Foi utilizado o pH inicial de 6,4. A melhor temperatura de incubação foi de 28° C e o tempo de fermentação foi de 96 h.

Maliszewska e Mastalerz (1992) estudaram a produção de lipase de *Penicillium citrinum* por fermentação submersa em frascos agitados. Foi estudado o efeito da adição de Tween 80 e óleo de oliva (0,1 a 1,0 %; p/v) bem como de ácidos graxos (láurico, palmítico, linoléico, linolênico e oléico) na concentração de 4 mM. Os autores observaram um aumento significativo da produção de lipase com a menor concentração do óleo de oliva e efeito estimulante crescente com aumento da concentração de Tween 80, até 0,7%. Foi detectado também, efeito positivo com os ácidos linoléico, linolênico e oléico, mas, inibição com o ácido láurico. A lipase não foi detectada no micélio tendo sido totalmente liberada no meio de cultivo.

### 3.6 Fungos Filamentosos Utilizados para a Produção de Lipases

A seleção do microrganismo é um dos critérios mais importantes a serem avaliados para utilização em processos fermentativos. Segundo Schmidell et al. (2001), de maneira geral, eles devem apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto; não devem produzir substâncias incompatíveis com o produto; não apresentar inconstância quanto ao comportamento fisiológico, não serem patogênicos e não serem exigentes quanto ao meio

de cultura. Uma grande variedade de microrganismos tem habilidade de produzir lipases. No entanto, do ponto de vista industrial, os fungos filamentosos são os preferidos como fontes dessas enzimas, pois geralmente as produzem extracelularmente, fator de grande importância, pois torna o processo de extração e obtenção menos oneroso (MAHADIK et al., 2002).

Segundo Colen, Junqueira e Moraes-Santos (2006), os fungos filamentosos quando estão sendo cultivados em condições favoráveis de crescimento são capazes de secretar quantidades significativas de lipases, sendo as espécies pertencentes aos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor*, as melhores produtoras.

Geralmente, a produção de lipase atinge seu ponto máximo quando a cultura entra na fase estacionária de crescimento, em seguida, a atividade diminui rapidamente, pois ocorre a proteólise catalisada por proteases produzidas durante a fase de crescimento celular (ZAREVUCKA et al., 2005; DALMAU et al., 2000).

Um dos primeiros requisitos para a produção de enzimas, como as lipases, em geral é a identificação e aquisição da linhagem microbiana, a qual deverá ser segura, sob o ponto de vista biológico. Além de serem seguros, os microrganismos utilizados nos processos fermentativos devem suportar condições adversas, manter constância fisiológica, ser de fácil cultivo, e ser tolerante à presença de substâncias tóxicas que podem ser geradas pelo metabolismo celular e apresentar alto rendimento (BON et al., 2008). De acordo com Mahadik et al. (2002), a fermentação no estado sólido pode auxiliar na obtenção de lipases ácidas, como a produzida pelo fungo *Aspergillus niger* (pH de 1,5 a 2,5).

Para a obtenção de metabólitos gerados pelos microrganismos, é necessário amplo estudo sobre a sua fisiologia. Portanto, para alcançar o êxito nos bioprocessos, as condições de fermentação e o estágio de desenvolvimento do microrganismo devem ser bem estabelecidos (PAPAGIANNE, 2004).

Os fungos são seres vivos eucarióticos, apresentam alta capacidade de adaptação, são pouco exigentes quanto aos nutrientes disponíveis e o seu crescimento pode ocorrer praticamente em qualquer tipo de substrato, pois apresentam uma variabilidade enzimática muito grande (ZAITZ, 1998). Além disso, os fungos podem crescer em condições de umidade e temperatura extremamente variáveis (LAZZARI, 1997). Já foram descritas mais de 100.000 espécies fúngicas, distribuídas em aproximadamente 3.000 gêneros (MENEZES, 2006).

Segundo Mitchell, Berovic e Krieger (2000) os fungos filamentosos são bastante atrativos para utilização na fermentação no estado sólido, principalmente devido a facilidade de crescimento em meios ácidos e capacidade de esporular, o que facilita o preparo do inóculo. Além disso, são os microrganismos mais adaptáveis a esse tipo de processo, pois são capazes de crescer em meios com baixo teor de água e com muitos sólidos presentes, além de apresentar crescimento por meio de hifas que favorecem a colonização no meio de fermentação (DURAND, 2003).

Fungos são organismos heterotróficos ou parasitas, podendo estar presentes no solo, nos vegetais, na água e nos mais variados ambientes, uma vez que possuem alta capacidade de dispersão. Podem ser pluricelulares, conhecidos como fungos filamentosos e os unicelulares, conhecidos como leveduras. O corpo de um fungo filamentoso consiste de filamentos longos de células conectadas denominadas hifas e o conjunto dessas hifas é denominado micélio (CORRÊA, 1995). Essa estrutura é dividida em micélio vegetativo, cujas hifas penetram no meio onde absorvem nutrientes e micélio aéreo ou reprodutivo, cujas hifas se projetam acima da superfície, dando suporte às células reprodutivas ou esporos (PAPAGIANNI, 2004). Os fungos filamentosos podem formar colônias com diferentes aspectos e colorações. O micélio é usualmente incolor e as diferentes tonalidades das colônias são decorrentes da produção de esporos assexuais, resultando em coloração verde, verde azulada, laranja, castanha, cinza ou preta. Os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* e *Rhizopus* apresentam coloração bastante

característica e que auxiliam na identificação das espécies (LEITÃO et al., 1988; TRABULSI e TOLEDO, 1991).

Os fungos filamentosos, popularmente conhecidos como mofo ou bolor, produzem vários tipos de metabólicos, como por exemplo: enzimas, álcoois, ácidos orgânicos, vitaminas, pigmentos corantes, polissacarídeos, esteróis e substâncias antibióticas. Além disso, algumas espécies são utilizadas no controle biológico de insetos/pragas da agricultura, são utilizados em processos de maturação de vários queijos e são ainda empregados em processos de biorremediação (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

### 3.6.1 *Aspergillus niger*

Segundo Gautam et al. (2011) o uso de *Aspergillus niger* em processos fermentativos apresenta vantagens em relação a outras espécies, como por exemplo, facilidade de manipulação e habilidade em fermentar uma grande variedade de matérias primas de baixo custo. Além disso, segundo Schuster et al. (2002), é um microrganismo considerado seguro para o uso industrial, em relação a patogenicidade, hipersensibilidade e produção de toxinas.

Existem cerca de 200 espécies, as quais são comumente isoladas do solo, de plantas em decomposição, do ar e de rejeitos industriais (SOARES, 2010). A maioria das espécies fúngicas apresenta temperatura ótima de crescimento entre 20-25°C, entretanto, existem espécies que podem crescer em temperaturas mais elevadas, acima de 35°C.

Na literatura são reportadas várias enzimas com relevância comercial e aplicação em biotecnologia produzidas pela espécie *Aspergillus niger*, como por exemplo: poligalacturonase, utilizada na clarificação de sucos de frutas (SANTOS e MACEDO, 2008); celulase, utilizada para o amaciamento de tecidos de algodão, limpeza e clarificação (AGUIAR, MARGONAR e LUCENA, 2008); protease, utilizada na remoção de manchas de proteínas e purga do couro (PARANTHAMAN, ALAGUSUNDARAM e INDHUMATHI, 2009); amilase, utilizada para melhorar a maciez e volume do pão (GUPTA et al., 2008).

A enzima que será produzida dependerá do tipo de substrato a ser utilizado na fermentação (PANDEY et al., 1999).

Além da produção de enzimas úteis, várias linhagens de *A. niger* são utilizadas na produção industrial de ácido cítrico e ácido glucônico, os quais foram avaliados como aceitáveis para ingestão diária pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e do Food and Drug Administration (FDA) (SCHUSTER et al., 2002).

*Aspergillus niger* é o principal microrganismo produtor de ácido cítrico, pois é capaz de crescer em meio contendo açúcares e sais e em pH de 2,5-3,5, excretando ao longo do seu crescimento grandes quantidades deste ácido. O ácido cítrico é bastante utilizado em grande escala industrial, como por exemplo, em refrigerantes e em produtos farmacêuticos (MAX et al., 2010). Segundo Baker (2006), a espécie *A. niger*, também desempenha um papel importante no ciclo global do carbono.

*Aspergillus niger* é um fungo comumente denominado como “mofo negro” (WAINWRIGHT, 1995). É um ascomiceto imperfeito (classe dos Deuteromicetos) que pode se desenvolver em meios líquidos e sólidos, apresentam colônias brancas a amarelo pálido, mas rapidamente esporulam e, conseqüentemente, tornam as colônias negras. Os conídios são esféricos, medem de 3 a 5 µm, apresentam hifas finas, septadas e conidióforos com vesículas recobertas por conídios negros (RODRIGUES, 2006). Imagens da estrutura microscópica desse fungo pode ser observada na Figura 2.



**Figura 2.** Estrutura microscópica de *A. niger*  
**Fonte:** (MAKIMURA, 2002).

*Aspergillus niger* é uma das poucas espécies de fungos que receberam o status de GRAS (generally regarded as safe) conferido pela Food and Drug Administration (FDA). O uso histórico dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* na produção de alimentos e bebidas tradicionais, como queijos e saquê, elevam-os ao status GRAS (IWASHITA, 2002).

### 3.7 Concentração Enzimática

As lipases são enzimas que possuem um amplo campo de aplicações. No entanto, o direcionamento para dada aplicação está relacionado também com o seu grau de pureza. Geralmente, os processos de separação da enzima envolve uma etapa de pré-purificação e posteriormente purificação por métodos cromatográficos (CASTIGLIONI, 2009).

A precipitação com sulfato de amônio é uma das técnicas mais utilizadas na etapa de pré-purificação ou concentração, sendo eficientes para a concentração de soluções protéicas e no fracionamento de mistura de proteínas (PESSOA JR e KILIKIAN, 2005).

De acordo com Lima et al. (2008) o sulfato de amônio tem sido o sal mais utilizado em precipitação devido a sua alta solubilidade, baixo custo e baixa toxicidade.

Após a fermentação e subsequente extração, a enzima encontra-se no meio contendo uma série de outros compostos que não são de interesse, dessa forma, uma das primeiras etapas geralmente realizadas é a separação das células do meio de cultura por meio de centrifugação e/ou microfiltração, seguida de concentração/pré-purificação.

A ausência ou redução de impurezas no extrato enzimático contribui para o aumento do nível de atividade, que permite a utilização de menores quantidades da enzima (PESSOA JR e KILIKIAN, 2005).

Segundo Neto (2007), a concentração enzimática pode ser realizada por várias técnicas: adição de um polímero do tipo Sephadex G-25; por ultrafiltração; liofilização ou precipitação. Os métodos de precipitação, por exemplo, além de concentrar o extrato enzimático, podem proporcionar, em alguns casos, uma purificação parcial da preparação enzimática.

Produtos destinados para uso terapêutico requerem maior grau de pureza e complexidade do processo de purificação. Já o seu uso em biocatálise pode requerer apenas processos parciais de purificação, caso os componentes presentes no extrato enzimático não interfiram na reação e no processo de obtenção dos produtos (KORNBERG, 1990).

A escolha do método de purificação da lipase é dependente do microrganismo utilizado, bem como do tipo de meio, das condições de cultura e das características da enzima. Devido o grande número de variáveis envolvidas, não há um processo de purificação que seja de aplicação geral (KORNBERG, 1990).

A liofilização é um método de desidratação de um material previamente congelado, em que o volume de água é removido por sublimação. Para facilitar a sublimação, se mantém uma pressão muito baixa e o vapor deve ser eliminado por condensação à baixa temperatura. É reconhecidamente o melhor método para obtenção de produtos desidratados de alta qualidade, pois o material permanece congelado até estar completamente seco, restando a forma original do material. É um método utilizado na produção de preparações enzimáticas, vacinas, frações de plasma e hormônios (PITOMBO, 2005).

A purificação enzimática tem dois objetivos básicos: obtenção de uma enzima pura para melhor estudo de suas características estruturais e bioquímicas e obtenção de um extrato com altos níveis de atividade, entretanto, processos de purificação costumam elevar consideravelmente o preço do produto final (PALEKAR, VASUDEVAN e YAN, 2000). No entanto, no presente trabalho foi realizado apenas o estudo da etapa anterior a purificação, são elas: concentração enzimática através da precipitação com sulfato de amônio e liofilização.

### 3.8 Caracterização de Lipases

Existe uma diversidade de lipases, as quais podem apresentar propriedades muito distintas entre si. Portanto, o estudo das propriedades bioquímicas das enzimas é de extrema importância para conhecer as particularidades de atuação enzimática e estabelecer as condições de processo, como por exemplo: a estabilidade em função da temperatura, do pH e a estocagem em baixas temperaturas (BACHA et al., 2005).

A termoestabilidade é uma das principais características requeridas para aplicação industrial de uma enzima, uma vez que muitos processos usam temperaturas em torno de 50°C ou maiores (SAXENA et al., 2003a), sendo que algumas enzimas são rapidamente inativadas a essas temperaturas.

Estas informações são relevantes para a aplicação industrial e são necessárias para manter o nível desejado de atividade da enzima por um longo período de tempo (SOUZA et al., 2010).

As lipases devem ser selecionadas para cada aplicação, sendo que estas podem ser baseadas na especificidade ao substrato, posição e estereoespecificidade, bem como, temperatura e pH ótimos e estabilidade a temperatura e ao pH (CARVALHO et al., 2008).

Na literatura são reportados vários trabalhos com o objetivo de caracterizar lipases de diferentes espécies microbianas e de diferentes origens. Os trabalhos demonstram que as faixas de atuação de lipases é bastante ampla, portanto, a caracterização torna-se fundamental após a otimização da produção de lipases.

Pastore, Costa e Koblitz (2003) estudaram as propriedades de uma lipase produzida por nova linhagem fúngica de *Rhizopus* sp e verificaram que a enzima bruta apresentou condições ótimas de atividade a 40°C e pH entre 6,0 e 6,5.

Estudo realizado por Tsuruda et al. (2006) constataram que a atividade máxima de lipases (0,65 U/mL) de *Trichoderma* sp. ocorreu em tampão citrato-fosfato pH 6,0 e a 50 °C. Benjamin e Pandey (2001) relataram que uma das lipases produzidas por *Candida rugosa* apresentou atividade ótima em pH 7,0 e temperatura de 40°C.

Carvalho et al. (2005) estudaram estabilidade de lipase de *Aspergillus niger* isolada de amostras de solo brasileiro em reações de esterificação. Resultados revelaram que esse microrganismo apresentou a maior atividade (18,2 U/mL) e foi altamente termoestável, restando 90% e 60% de atividade a 50°C e 60°C, respectivamente.

Vici et al. (2011) avaliaram a atividade das lipases intra e extracelulares produzidas por *Aspergillus niger*. Resultados obtidos pelos autores revelaram que a melhor faixa de temperatura de reação foi de 40° a 55°C para as lipases intracelulares e de 45° a 55°C para as extracelulares. Ambas as lipases obtiveram melhor atividade em pH de 3,0 a 6,0. Pinheiro

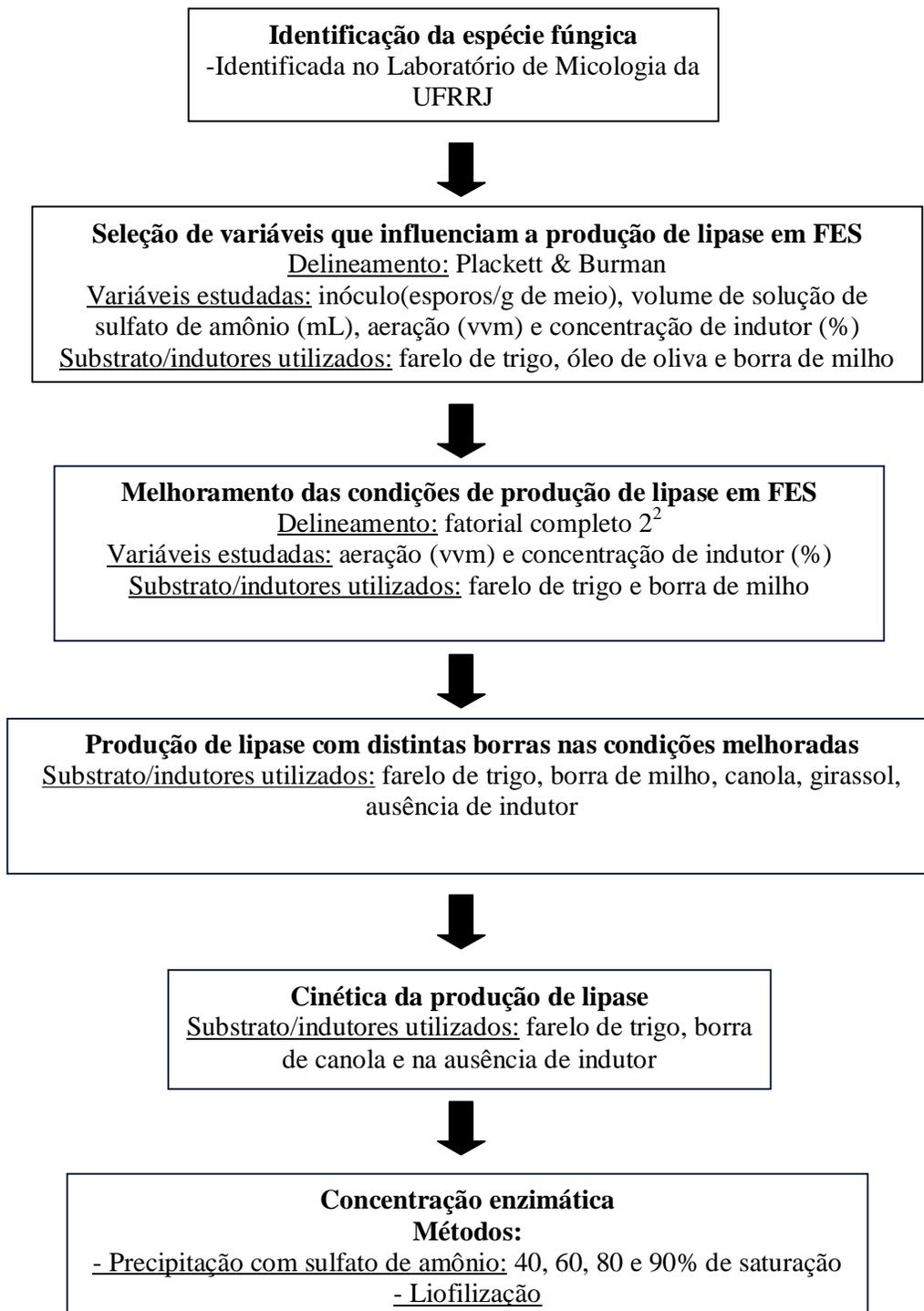
(2006) concluiu que a temperatura e pH ótimos da lipase de *Penicillium verrucosum* foi de 44°C e pH 7,0, enquanto Shu, Xu e Lin (2006) verificaram que a temperatura ótima da lipase de *Antrodia cinnamomea* foi de 45°C e pH de 8,0.

Estudo realizado por Camargo et al. (2003), verificaram que a lipase produzida por *Fusarium oxysporum* apresentou atividade máxima a 37°C. Burket et al. (2001) realizaram a caracterização parcial da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meio sintético contendo peptona e óleo de soja. Segundo os autores, a lipase apresentou pH e temperatura ótimos de 7,0 e 37°C, já a estabilidade térmica da enzima foi relativamente baixa, com uma meia-vida de 3,6 h (37°C e pH 7,0) e a atividade enzimática foi quase totalmente inibida pela presença de íons Cu<sup>2+</sup> e Ag<sup>+</sup> e, parcialmente inibida, pela presença de Fe<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>.

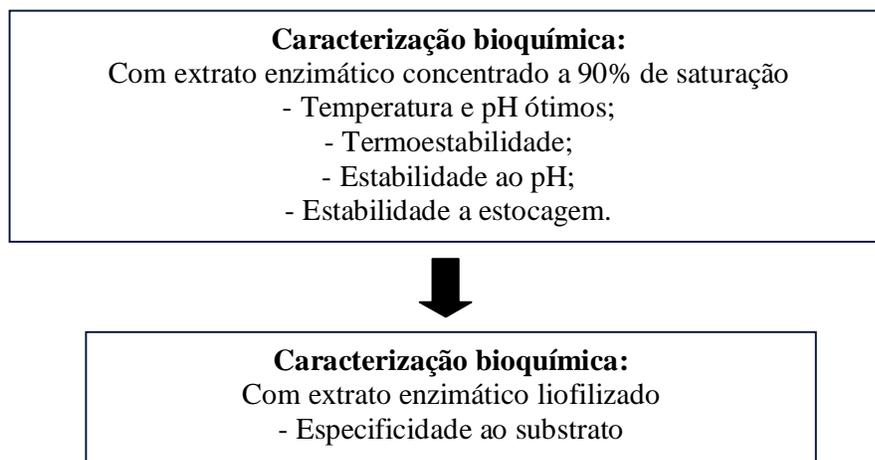
## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados e desenvolvidos nos Laboratórios de Processos Fermentativos e Óleos Graxos da Embrapa Agroindústria de Alimentos, localizada em Pedra de Guaratiba, Rio de Janeiro/RJ.

Na Figura 3 pode ser observado um fluxograma contendo as etapas realizadas ao longo do trabalho, de Tese.



Continuação do fluxograma...



**Figura 3.** Fluxograma das etapas realizadas ao longo do trabalho

#### 4.1 Microrganismo

A linhagem de *Aspergillus niger* utilizada neste trabalho foi isolada de amostras de manteiga e selecionada como boa produtora de lipase em um trabalho de screening realizado por Moreira et al. (2009). Posteriormente, o microrganismo foi identificado no Laboratório de Micologia e Micotoxicologia da UFRRJ, empregando-se a metodologia descrita em Samson et al. (2007) e verificou-se que se tratava da espécie *A. niger*. A cultura fúngica está depositada na Coleção de Microrganismos de interesse da Indústria de Alimentos e Agroenergia da Embrapa Agroindústria de Alimentos -RJ.

#### 4.2 Matérias – primas

Na Tabela 6 estão apresentadas as principais matérias-primas utilizadas para a produção da enzima com seus respectivos fornecedores. O farelo de trigo e as borras alcalinas foram armazenados sob refrigeração. Na Figura 4 pode ser observado as amostras das borras utilizadas no presente trabalho.

**Tabela 6.** Matérias-primas empregadas para a produção de lipase de *Aspergillus niger* por fermentação no estado sólido (FES).

Matérias-primas	Fornecedores
Borra alcalina de milho, canola e girassol	Indústrias Granfino S/A, Nova Iguaçu, RJ, Brasil
Farelo de trigo	Bunge Alimentos S.A
Óleo de oliva	®Faisão



**Figura 4.** Borra de girassol (A), borra de canola (B), borra de milho (C).

### 4.3 Estocagem e Ativação do Microrganismo

O fungo foi estocado em solo congelado, previamente esterilizado por sete vezes, e ativado em gelose inclinada constituída pelos nutrientes descritos na Tabela 7 (COURI e FARIAS, 1995). O pH do meio de cultura foi ajustado para pH 5,5 e, em seguida, esterilizado a 121°C por 15 min. Para a ativação da linhagem, foram realizados dois repiques sucessivos e incubados em B.O.D. por 5 dias a 32°C, para o seu desenvolvimento.

**Tabela 7.** Composição do meio de ativação do microrganismo

Componentes	Fornecedores	Concentração (g/L)
Nitrato de sódio (NaNO <sub>3</sub> )	Reagen	3,00
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> )	Reagen	0,5
Cloreto de potássio (KCl)	Vetec	0,5
Sulfato ferroso (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	Baker Chemical	0,01
Fosfato dibásico de potássio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Grupo química	1,0
Agar-ágar	Isofar	30,0
Óleo de oliva	Faisão	20,0 (mL/L)

### 4.4 Propagação de Esporos

Após a ativação, foram adicionados aproximadamente 10 mL de solução 0,1% de Tween 80 nos tubos de gelose para o desprendimento dos conídios de *Aspergillus niger*. Posteriormente, 1,0 mL da suspensão foi transferido para frascos cônicos contendo meio de sabugo de milho. Este meio é bastante utilizado para produzir grandes quantidades de esporos, pois apresenta maior superfície de contato se comparado com a gelose descrita na Tabela 7. Os frascos inoculados foram incubados por 5 dias a 32°C para a propagação de conídios. Para o preparo desse meio, primeiramente, o milho é obtido no comércio local, em seguida é cozido, debulhado e seco em estufa a 100°C, por aproximadamente 4 horas. Posteriormente, o sabugo é moído em moinho de facas utilizando peneira de 6 mm e mantido em freezer.

Segundo metodologia descrita por Gomes (1995), para cada frasco cônico, utilizou-se 4,6 g de sabugo de milho (seco e triturado) enriquecido com 6 mL de uma solução constituída por peptona, HCl, fosfato de potássio e sulfato de zinco. Os frascos foram esterilizados a 121°C por 1 hora.

#### 4.5 Preparo do Inóculo para ser Utilizado na Fermentação

Após o período de 5 dias para a propagação de conídios foram adicionados aos frascos cônicos aproximadamente 20 mL de solução 1% de Tween 80 seguido de homogeneização. Posteriormente, foi realizada a filtração em gaze estéril para a obtenção da suspensão, cuja concentração foi determinada através de contagem ao microscópio óptico em câmara de Neubauer (ANEXO A).

#### 4.6 Meio de Fermentação para a Produção de Lipase em FES

Os meios foram preparados em frascos cônicos contendo 100g de farelo de trigo triturado (tamanho do grão  $\leq 5$  mm), umedecidos com solução de sulfato de amônio (VSSA) a 1,2% (p/v) pH 7,0 e acrescidos ou não com diferentes concentrações de indutores: óleo de oliva e borras alcalinas (Figura 4). Os meios foram homogeneizados e esterilizados a 1 atm por 15 minutos, sendo posteriormente inoculados com suspensão de conídios, conforme os planejamentos experimentais descritos nos itens 4.11.1 e 4.11.2

#### 4.7 Avaliação do Teor de Óleo Presente no Farelo de Trigo

O farelo de trigo coproduto utilizado como substrato durante a FES, foi avaliado quanto o teor de óleo, no laboratório de físico-química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A extração foi realizada em equipamento de soxhlet através do uso do solvente éter de petróleo, conforme metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985).

#### 4.8 Composição das Borras Alcalinas Realizada por Santos (2012)

As borras alcalinas são resíduos provenientes do refino de óleos e sua composição depende de vários fatores, como por exemplo, condições do refino e concentração e tipo do agente neutralizante (FRÉ, 2009).

Santos (2012) estudou a produção de lipases por uma linhagem mutante de *A. niger* codificada como 11T53A14 e utilizou como fonte indutora as mesmas borras alcalinas utilizadas no presente trabalho. O autor realizou a caracterização físico-química das borras de canola, milho e girassol, apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Resultados das análises físico-químicas realizadas nas borras

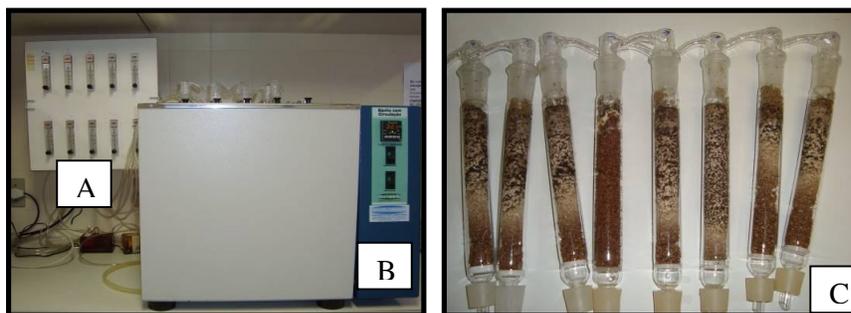
Análises	Borra de canola		Borra de milho		Borra de girassol	
	Média	CV(%)	Média	CV(%)	Média	CV(%)
Umidade (%)	41,88±1,36	3,24	52,59±1,77	3,36	29,72±0,94	3,15
Resíduo de sabão*(%)	39,34±1,16	2,95	31,82±0,42	1,33	47,50±1,20	2,52
Óleo neutro (%)	16,98±0,82	4,83	25,09±1,10	4,37	18,11±3,21	17,71
Cinzas (g/100g)	5,37±0,15	2,77	3,56±0,04	1,19	7,15±0,01	0,20
pH	8,22	-	8,80	-	8,60	-

\*Resíduo de sabão foi expresso em oleato de sódio.

CV = coeficiente de variação  
(SANTOS, 2012)

#### 4.9 Condução da Fermentação para a Produção de Lipase

A fermentação para a produção da lipase foi conduzida em colunas cilíndricas (21,0 cm x 2,2 cm) aeradas, contendo aproximadamente 17g do meio de cultivo e imersas em banho termostático com circulação de ar a 32°C por 48 horas (Figura 5).



**Figura 5.** Aparato instrumental para a fermentação de lipase conduzida em colunas aeradas. Rotâmetros (A), banho termostatizado (B), colunas contendo meio de cultivo já fermentado (C).

#### 4.10 Obtenção do Extrato Enzimático

Após a produção da enzima por fermentação no estado sólido, procedeu-se a extração enzimática através da adição de 2,5 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 (ANEXO B) por grama de meio fermentado e, sob agitação, em banho Maria a 100 rpm por uma hora a 32°C.

Posteriormente, os meios fermentados foram homogeneizados e filtrados em papel filtro quantitativo J.Prolab® e em seguida microfiltrados através de membranas de celulose milipore® com porosidade de 0,45µm. Dessa forma, pode-se obter o extrato enzimático bruto.

#### 4.11 Estudo da Produção de Lipase por *A. niger* em FES em Colunas Aeradas Utilizando Planejamento de Experimentos

##### 4.11.1 Delineamento de Plackett & Burman

A necessidade crescente da otimização ou melhoramento dos processos biotecnológicos, minimizando custos e tempo, maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos, tem levado vários pesquisadores a buscarem técnicas de planejamento de experimentos (RODRIGUES e IEMMA, 2005). Neste contexto, foram utilizados dois planejamentos de experimentos, a saber: Plackett & Burman e Fatorial Completo.

O planejamento experimental de Plackett & Burman foi utilizado com o objetivo de selecionar as variáveis que influenciam de forma significativa a produção de lipases por fermentação no estado sólido (Tabelas 9 e 10). Para o estudo das condições da produção de lipases por fermentação no estado sólido foram analisadas quatro variáveis: concentração de inóculo, concentração de fontes lipídicas, volumes de solução de sulfato de amônio (VSSA) e aeração, em três níveis de valores conforme apresentado na Tabela 9. As fontes lipídicas utilizadas nos experimentos distintos foram: borra alcalina de milho e óleo de oliva ®Faisão.

Para cada planejamento foram realizados 12 ensaios e três pontos centrais (13, 14 e 15), como pode ser observado na Tabela 10.

Segundo Singhania et al. (2009), as variáveis estudadas no presente trabalho, são os principais fatores relacionados com a eficiência dos processos fermentativos, e por isso foram estudadas.

**Tabela 9.** Níveis e variáveis estudadas no planejamento de Plackett & Burman para a seleção de variáveis que influenciam na produção de lipase.

Níveis	Variáveis			
	Inóculo (esporos/g de meio)	VSSA (mL)	Aeração (vvm)	Concentração de indutor (%)
-1	10 <sup>6</sup>	40	0,5	0,5
0	10 <sup>7</sup>	60	1,0	1,5
+1	10 <sup>8</sup>	80	1,5	2,5

VSSA = volume de solução de sulfato de amônio

**Tabela 10.** Matriz gerada para o planejamento experimental de Plackett & Burman para a produção de lipase com seus níveis codificados e valores reais (entre parênteses).

Ensaio	Inóculo (esporos/g de meio)	VSSA (mL)	Aeração (vvm)	Indutor (%) (borra de milho ou óleo de oliva)
1	+1(10 <sup>8</sup> )	-1(40)	+1(1,5)	-1(0,5)
2	+1(10 <sup>8</sup> )	+1(80)	-1(0,5)	+1(2,5)
3	-1(10 <sup>6</sup> )	+1(80)	+1(1,5)	-1(0,5)
4	+1(10 <sup>8</sup> )	-1(40)	+1(1,5)	+1(2,5)
5	+1(10 <sup>8</sup> )	+1(80)	-1(0,5)	+1(2,5)
6	+1(10 <sup>8</sup> )	+1(80)	+1(1,5)	-1(0,5)
7	-1(10 <sup>6</sup> )	+1(80)	+1(1,5)	+1(2,5)
8	-1(10 <sup>6</sup> )	-1(40)	+1(1,5)	+1(2,5)
9	-1(10 <sup>6</sup> )	-1(40)	-1(0,5)	+1(2,5)
10	+1(10 <sup>8</sup> )	-1(40)	-1(0,5)	-1(0,5)
11	-1(10 <sup>6</sup> )	+1(80)	-1(0,5)	-1(0,5)
12	-1(10 <sup>6</sup> )	-1(40)	-1(0,5)	-1(0,5)
13*	0(10 <sup>7</sup> )	0(60)	0(1,0)	0(1,5)
14*	0(10 <sup>7</sup> )	0(60)	0(1,0)	0(1,5)
15*	0(10 <sup>7</sup> )	0(60)	0(1,0)	0(1,5)

\*Pontos centrais

VSSA = volume de solução de sulfato de amônio

#### 4.11.2 Delineamento fatorial completo 2<sup>2</sup>

Após a seleção das variáveis que influenciaram de forma significativa a produção de lipases, foi realizado o delineamento fatorial completo para 2 variáveis independentes, sendo elas: aeração e concentração de borra de milho (Tabela 11). O objetivo deste delineamento foi verificar a melhor condição para a produção de lipase de *A. niger*. Foram realizados 4 ensaios

e três pontos centrais (5, 6 e 7), como podem ser observados nas Tabelas 12. Este delineamento foi realizado em duplicata.

**Tabela 11.** Níveis e variáveis estudadas no planejamento fatorial completo  $2^2$  para o melhoramento das condições de produção de lipase.

Níveis	Variáveis	
	Aeração (vvm)	Concentração de borra de milho (%)
-1	0	0
0	0,5	0,5
+1	1	1

**Tabela 12.** Matriz gerada para o delineamento fatorial completo  $2^2$  com seus níveis codificados e valores reais (entre parênteses).

Ensaio	Aeração (vvm)	Concentração de borra de milho (%)
1	-1(0,0)	-1(0,0)
2	+1(1,0)	-1(0,0)
3	-1(0,0)	+1(1,0)
4	+1(1,0)	+1(1,0)
5*	0(0,5)	0(0,5)
6*	0(0,5)	0(0,5)
7*	0(0,5)	0(0,5)

\* Pontos centrais

#### 4.12 Produção de Lipases Empregando Distintas Borrás Alcalinas

Com o objetivo de avaliar a capacidade de outras borras induzirem a produção de lipase de *A. niger*, bem como de se avaliar a capacidade do fungo filamentosos em produzir a enzima sem a adição de fontes lipídicas, foram realizados ensaios utilizando-se as borras de girassol e de canola, além da borra de milho e sem adição de indutor. Os ensaios foram realizados nas condições de processo selecionadas no delineamento fatorial completo  $2^2$ :  $10^6$  esporos/g de meio; 1 vvm de aeração; 1% de borra e 60 mL de VSSA. Os extratos enzimáticos obtidos foram avaliados em termos de atividades lipásica, proteásica e específica aparente.

#### 4.13 Cinética da Produção de Lipase por *A. niger* em FES e em Colunas Aeradas utilizando Planejamento de Experimentos

A cinética foi realizada com o intuito de conhecer o perfil de produção da lipase e identificar o tempo ótimo da produção da enzima, nas condições estudadas. Os meios foram preparados de acordo com a melhor condição obtida no planejamento fatorial completo  $2^2$ . As colunas contendo o meio fermentado foram retiradas nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas. Os

pontos foram preparados em duplicata e, de cada um deles, foram retirados 2g de meio para determinação da umidade e após seco foi determinado o teor de glicosamina.

Os meios foram extraídos com solução tampão, filtrados e microfiltrados até a obtenção do extrato enzimático bruto, como descrito no item 4.10 e posteriormente foram avaliados quanto as atividades lipásica (U/gms) e proteásica (U/mL) descrita nos itens 4.14 e 4.18, respectivamente.

#### **4.13.1 Determinação do crescimento microbiano**

A glicosamina é um açúcar presente na parede celular dos fungos, no ergosterol e no açúcar total. Para avaliação do crescimento microbiano foi seguida a metodologia descrita por Blix (1948); Sakurai, Lee e Shiota (1977). Este método divide-se em quatro etapas: extração, neutralização, acetilação e condensação. Foram adicionados 2 mL de solução de ácido sulfúrico a 70% nas amostras contendo 0,5g de meio fermentado referente a cada ponto de fermentação (0, 24, 48, 72 e 96 horas) e permaneceram por 24 horas nesta solução para promover a digestão das amostras. Em seguida, foram diluídas em 5 mL de água destilada e autoclavadas por 1 hora a 1 atm. Posteriormente foram filtradas quantitativamente em papel de filtro J.Prolab®.

O filtrado foi neutralizado com hidróxido de sódio 5N até alcançar pH 7, em seguida avolumados para 100mL em balão volumétrico. Para a realização da etapa de acetilação, foi retirado 1mL da solução neutralizada, adicionados 1mL da acetilacetona e submetidas a fervura por 20 minutos. Em seguida, procedeu-se a etapa de condensação, através da adição de 5 mL de etanol seguido imediatamente de 1mL da solução de p-dimetilaminobenzaldeído e mais 5mL de etanol, agitando vigorosamente com o vortex até completa dissolução do condensado formado. Após 45 minutos de reação, realizou-se a leitura de absorvância em espectrofotômetro a 530nm e para a construção da curva padrão utilizou-se glicosamina em água (ANEXO C).

#### **4.14 Determinação da Atividade Lipásica**

A atividade lipásica do extrato bruto foi determinada pelo método titulométrico, segundo o procedimento descrito por Pereira et al. (2001), com pequenas modificações.

Para a determinação da atividade lipásica foi preparada uma emulsão constituída por água e óleo de oliva extra-virgem Borges® na proporção de 1:1 e 7% de goma arábica. Desta emulsão, foram adicionados 5mL em frascos de vidro, juntamente com 4 mL de tampão citrato 0,05M pH 4,0 (ANEXO D) e 1mL do extrato bruto de cada ensaio, separadamente. As amostras foram mantidas em banho Maria, sob agitação a 100 rpm a 35°C por 15 minutos, para condução da reação de hidrólise (Figura 6).

Após este período, a reação foi interrompida com a adição de 10 mL de uma solução 1:1:1 v/v de acetona/etanol/água. Os ácidos graxos liberados durante a reação foram então quantificados em titulador automático com NaOH 0,05N até pH final de 11,0. As amostras foram preparadas em triplicata e como controle foram preparados brancos em duplicata, nos quais 1mL do extrato enzimático foi adicionado somente no momento da titulação. Uma unidade de atividade lipásica foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de ácidos graxos por minuto, sob as condições de ensaio padrão. O valor da atividade lipásica em U/mL foi calculado conforme a equação 1 descrita a seguir:

$$A = \frac{(V_a - V_b) \cdot N \cdot 1000}{V_{ext} \cdot t} \quad (Eq. 1)$$

**Onde:**

A = atividade lipásica (U/mL)

V<sub>a</sub> = volume de solução de NaOH 0,05 N, de fator de correção conhecido, gasto para titular os ácidos graxos da reação enzimática (mL)

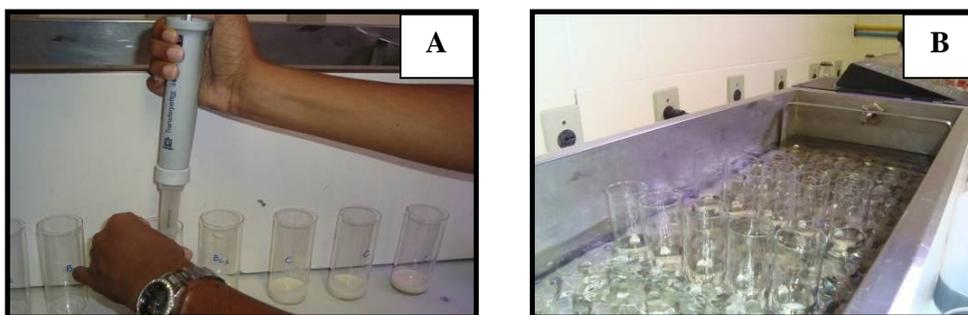
V<sub>b</sub> = volume de solução de NaOH 0,05 N, de fator de correção conhecido, gasto para titular os ácidos graxos presentes no branco da amostra (controle)

N = normalidade da solução de NaOH

V<sub>ext</sub> = volume do extrato enzimático usado na reação (mL) = 1 mL

t = tempo de reação (minutos) = 15 min.

Após calculada a atividade lipásica em U/mL, foi feito o cálculo da atividade em U/g de massa seca (U/gms), considerado-se a massa seca e a umidade do meio fermentado (ANEXO E).



**Figura 6.** Meio reacional (A), reação de hidrólise em banho Maria a 35°C com agitação (B).

#### 4.15 Determinação de Proteínas Totais

A determinação da concentração de proteína no extrato bruto foi realizada por método colorimétrico conforme metodologia descrita por Lowry et al. (1951). Este método baseia-se na produção de um composto azul formado a partir da reação entre o reagente Folin-Ciocalteu e o complexo cobre-proteína. Os dados de absorvância foram medidos utilizando espectrofotômetro a 660 nm e albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como padrão de proteína, para a construção da curva de calibração (ANEXO F).

#### 4.16 Determinação da Umidade

A umidade das amostras do meio de cultivo foi realizada antes da fermentação e determinada por gravimetria, através da perda de água sofrida até atingir peso constante conforme equação 2.

$$\text{Umidade \%} = \frac{\text{massa inicial (g)} - \text{massa final (g)}}{\text{massa inicial}} \times 100 \quad (Eq. 2)$$

#### 4.17 Atividade Lipásica Específica Aparente

A atividade lipásica específica aparente (U/g de proteína) foi calculada pela razão entre os resultados de atividade lipásica U/mL e concentração de proteínas g/mL (Equação 3).

$$\text{Atividade específica aparente} = \frac{\text{Atividade enzimática (U/mL)}}{\text{Concentração de proteína (g/mL)}} \quad (\text{Eq. 3})$$

#### 4.18 Determinação da Atividade Proteásica

A determinação da atividade proteásica no extrato enzimático tem grande influência na atividade lipásica final, pois as proteases podem hidrolisar as lipases.

A determinação da atividade das enzimas proteolíticas foi realizada conforme metodologia descrita por Charney e Tomarelli (1947). O método baseia-se na formação de derivados corados em meio alcalino, a partir da digestão de uma solução de azocaseína. A mistura reacional foi constituída por 0,5 mL de solução 0,5% de azocaseína em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e 0,5 mL do extrato enzimático. Após 40 min de reação a 37°C, foi adicionado 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA), como agente de precipitação.

Após a precipitação, a amostra foi centrifugada a 2000 rpm por 10 min a 10°C, para precipitação de sólidos em suspensão. Em seguida, foi recolhido 1 mL do sobrenadante e adicionado a 1 mL de solução hidróxido de sódio (KOH) 5 N, para formação do composto cromóforo. Para cada amostra foi feito um branco utilizando-se extrato enzimático inativado em banho-maria a 100°C por 20 min. A atividade enzimática foi expressa pela diferença de absorvância entre os ensaios com preparados enzimáticos e os seus respectivos brancos, medida a 428 nm, em espectrofotômetro da marca Biospecto modelo SP-220. Toda a análise foi feita em duplicata e a atividade proteásica foi expressa em U/mL. Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de 0,01 de absorvância por minuto de reação entre o branco reacional e a amostra nas condições de ensaio.

#### 4.19 Concentração do Extrato Enzimático

##### 4.19.1 Precipitação com sulfato de amônio

Com o objetivo de verificar o efeito do processo de precipitação por sulfato de amônio sobre a atividade lipásica, foram realizadas quatro condições de saturação (40, 60, 80 e 90%) e após a avaliação da melhor condição, foi realizada a caracterização bioquímica com a amostra concentrada. Para o processo de precipitação por sulfato de amônio seguiu-se a metodologia descrita por England e Seifter (1990).

A volumes de 30 a 60 mL do extrato enzimático bruto foram adicionadas, lentamente, quantidades determinadas de sulfato de amônio, sob agitação a 20°C, até obter as saturações pretendidas. Em seguida, as amostras foram mantidas refrigeradas *over night*. Decorrido este tempo, as amostras foram centrifugadas a 4500 rpm a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi removido, e o precipitado ressuspensionado em 5-10mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0. Em seguida, as amostras (precipitado e sobrenadante) de cada tratamento foram submetidas à dessalinização por processo de diálise a 4°C por 24h com trocas sucessivas de tampão. Após a diálise, o volume final foi medido, e as análises de atividade lipásica e proteína total foram realizadas. A eficiência do processo de precipitação com sulfato de amônio foi avaliada pela

recuperação da atividade enzimática (RA) e pelo fator de purificação (FP), dados pelas equações 4 e 5, respectivamente (BIAZUS et al., 2006; SANTOS, 2001; TOLEDO et al., 2007).

$$RA = \frac{\text{Atividade enzimática total do concentrado}}{\text{Atividade enzimática total da amostra}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

$$FP = \frac{\text{Atividade enzimática específica do concentrado}}{\text{Atividade enzimática específica da amostra}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

#### 4.19.2 Concentração por liofilização

A concentração do extrato enzimático bruto por liofilização foi realizada em liofilizador sob vácuo  $1,5 \times 10^{-3}$  torr, a  $-55^{\circ}\text{C}$ . Para este processo foi utilizado 480 mL de extrato enzimático, o qual foi concentrado em 6,4 vezes. Após a concentração por aproximadamente 24 horas, entretanto, não foi realizada de forma contínua, o volume final foi medido, e a análise de atividade lipásica e proteína total foram realizadas. A amostra liofilizada foi utilizada para os testes de especificidade em diferentes óleos.

#### 4.20 Caracterização Bioquímica da Lipase

Toda a caracterização bioquímica, exceto as análises de especificidade, foram realizadas com extrato enzimático concentrado por precipitação com sulfato de amônio a 90% de saturação, conforme descrito no item 4.19.1.

##### 4.20.1 Determinação da temperatura e pH ótimos

Para a determinação da temperatura e pH ótimos da lipase, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR  $2^2$ ) para duas variáveis independentes, sendo elas: temperatura e pH em cinco níveis de valores conforme apresentado na Tabela 13. Foram realizados oito ensaios e quatro pontos centrais (9, 10, 11 e 12) (Tabela 14).

A atividade lipásica foi determinada conforme metodologia descrita anteriormente, substituindo apenas os valores da temperatura de reação e do pH das soluções tampões pelos valores apresentados na Tabela 14. Para os valores de pH de 3 a 5,6 utilizou-se tampão citrato de sódio 0,05M (ANEXO D), e para os valores de 7,3 e 8,0 foi utilizado tampão fosfato de sódio 0,1M (ANEXO B). As análises dos resultados foram feitas utilizando-se o *software Statistica* versão 6.0, considerando 5% de significância.

**Tabela 13.** Níveis e variáveis estudadas no delineamento composto central rotacional (DCCR 2<sup>2</sup>) para avaliação da temperatura e pH ótimos da lipase de *A. niger*.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Temperatura (°C)	30	37	55	73	80
pH	3	3,6	5,6	7,3	8

**Tabela 14.** Matriz do delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup> com seus níveis codificados e reais para avaliação da temperatura e pH ótimos da lipase de *A. niger*.

Ensaio	Variáveis	
	Temperatura (°C)	pH
1	-1(37)	-1 (3,6)
2	+1(73)	-1 (3,6)
3	-1 (37)	+1 (7,3)
4	+1 (73)	+1 (7,3)
5	-1,41 (30)	0 (5,6)
6	+1,41 (80)	0 (5,6)
7	0 (55)	-1,41 (3,0)
8	0 (55)	+1,41 (8,0)
9*	0 (55)	0 (5,6)
10*	0 (55)	0 (5,6)
11*	0 (55)	0 (5,6)
12*	0 (55)	0 (5,6)

\*Pontos centrais

#### 4.20.2 Determinação da termoestabilidade

A investigação do efeito desnaturante da temperatura sobre a enzima foi realizada incubando-se, em banho Maria, 30mL de extrato enzimático a temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C e 60°C. Em intervalos de 2h, 4h, 6h, 24h e 30h, alíquotas foram retiradas e a atividade residual da lipase foi mensurada, conforme descrito anteriormente.

#### 4.20.3 Determinação da estabilidade ao pH

A investigação do efeito desnaturante do pH sobre a enzima foi realizada incubando-se o extrato enzimático em banho Maria a 20°C. O extrato foi diluído na relação 1:2 enzima:tampão, com tampões de diferentes valores de pH. As soluções tampões utilizadas foram: tampão citrato de sódio 0,05M para os valores de pH: 3,0; 4,0 e 5,0 e tampão fosfato de sódio 0,1M para pH 6,0; 7,0 e 8,0. Em intervalos de 2h, 4h, 6h, 24h e 30h, alíquotas foram retiradas e a atividade residual da lipase foi mensurada.

#### 4.20.4 Determinação da estabilidade a estocagem

Para avaliar a estabilidade da lipase a estocagem, o extrato enzimático foi mantido em geladeira a 5°C e em freezer a -18°C, por 150 dias. Alíquotas foram retiradas em intervalos de 3, 6, 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias, e análises de atividade residual da lipase foram realizadas.

Para a estabilidade a temperatura de congelamento foram considerados intervalos a partir de 30 dias de estocagem.

#### 4.20.5 Perfil de ácidos graxos de diferentes óleos e especificidade enzimática

##### 4.20.5.1 Composição dos óleos

Foram obtidos no comércio local três óleos com características distintas, a saber: óleo de oliva extra virgem ®Borges, óleo de girassol ®Liza e óleo de coco extra virgem ®Copra.

Os óleos foram caracterizados quanto a composição em ácidos graxos. Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) de cada substrato foram preparados de acordo com o método descrito por Hartman e Lago (1973) e analisado por cromatografia em fase gasosa em equipamento Agilent Technologies modelo 6890 N, equipado com detector de ionização por chama, operado a 280°C. Utilizou-se coluna capilar de sílica fundida de filme de cianopropilsiloxano (60m x 0,32mm x 0,25µm). Realizou-se a identificação por comparação dos tempos de retenção com os padrões da NU-CHEK PREP, Inc. (Elysian, MN).

##### 4.20.5.2 Especificidade

A especificidade das lipases é fator crucial na determinação de suas aplicações industriais. A capacidade de atuarem seletivamente sobre seus substratos depende da fonte da enzima (CASTRO et al., 2004), do tamanho da cadeia carbônica ou do grau de insaturação do grupo acil em questão (GUPTA, GUPTA e RATHI, 2004).

Após a caracterização do perfil em ácidos graxos de cada óleo, realizou-se os testes de especificidade do extrato enzimático liofilizado.

A hidrólise enzimática foi conduzida conforme descrito no item 4.14 e realizadas 4 repetições em triplicata. A taxa de hidrólise para cada óleo foi calculada conforme a equação 6.

$$\% \text{ de ácidos graxos livres} = \frac{N * (V_a - V_b) * f * 100 * 100}{A * (d * v) / V} \quad (\text{Eq. 6})$$

**Onde:**

N = normalidade da solução de NaOH (0,05)

V<sub>a</sub> = volume de solução de NaOH 0,05 N gasto para titular os ácidos graxos da reação enzimática (mL)

V<sub>b</sub> = volume de solução de NaOH 0,05 N, gasto para titular os ácidos graxos presentes no branco da amostra (controle)

f = fator de conversão do ácido oléico (28,2)

A = alíquota utilizada na titulação

d = densidade do óleo (0,9)

v = volume de óleo utilizado no preparo da emulsão

V = volume final da emulsão

#### 4.21 Estatística

Os planejamentos experimentais foram avaliados com 90% de confiança através do programa Statistica 6.0. No planejamento de Plackett & Burman avaliou-se os efeitos das variáveis e no delineamento fatorial completo utilizou-se a análise de variância (ANOVA).

Foi utilizado o teste de comparação de médias (Tukey) para identificar se houve diferenças significativas ao nível de 90% de confiabilidade, entre as três distintas borras alcalinas e na ausência de indutor através do programa Sisvar, versão 5.3.

O delineamento composto central rotacional (DCCR 2<sup>2</sup>) utilizado para a determinação da temperatura e pH ótimos da lipase foi avaliado com 95% de confiabilidade através da análise de variância (ANOVA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação do Teor de Óleo Presente no Farelo de Trigo Utilizado como Matéria-prima para a FES.

Vários resíduos agroindustriais tem sido utilizados como substrato/suporte para a produção de enzimas, entre eles destaca-se o farelo de trigo.

Verificou-se a presença de 3,55% ( $\pm 0,92$ ) de óleo no farelo de trigo, que podem agir como indutores para a produção da lipase. O resultado obtido no presente trabalho é próximo aos encontrados por outros autores, 3,34% (HENZ et al., 2009) e 2,8% (FRANCO, 2007).

Schuber et al. (2012) utilizaram farelo de trigo fornecido pela Bunge alimentos, como substrato para a produção de  $\beta$ -galactosidase em FES. Os autores realizaram a composição físico-química do farelo e verificaram a presença de 61,15% de carboidratos, 17,32% de proteínas, 4,3% de cinzas, 45,3% de fibra bruta e 4,29% de lipídeo, este último é próximo ao valor encontrado no presente trabalho.

### 5.2 Estudo da Produção de Lipase

Os experimentos conduzidos para produção de lipases buscaram determinar condições de meio e de processo que pudessem melhorar os níveis de atividade da enzima. Primeiramente, foram feitos estudos de seleção de variáveis (5.2.1) e em seguida, com as variáveis que demonstraram ser significativas para o processo foi realizado um planejamento fatorial completo, visando aumentar os níveis de atividade de lipase (5.2.2).

#### 5.2.1 Planejamento de Plackett & Burman

O planejamento experimental de Plackett & Burman foi utilizado com o objetivo de selecionar as variáveis que influenciam de forma significativa a produção de lipases. Foram estudadas quatro variáveis de processo: concentração de inóculo, concentração de fontes lipídicas, volumes de solução de sulfato de amônio (VSSA) e aeração, como descrito no item 4.11.1.

O nível de umidade do meio é um fator importantíssimo para a FES, pois é preciso conter água livre suficiente para permitir o crescimento do microrganismo. Os volumes de solução de sulfato de amônio adicionados ao meio (40, 60 e 80 mL), propiciaram diferentes porcentagens de umidade, fator comumente testado na FES. A concentração do indutor também é de suma importância, pois as enzimas que são produzidas de forma induzida necessitam de quantidades adequadas de indutores.

No planejamento de Plackett & Burman avaliou-se os efeitos das variáveis sobre a produção da enzima, com 90% de confiabilidade. Este nível de confiança foi utilizado devido a heterogeneidade do meio de produção (em virtude de no processo fermentativo no estado sólido existir heterogeneidade do meio de produção), além de falta de sensibilidade no

controle de aeração e umidade nas colunas aeradas que foram utilizadas. Os resultados de atividade lipásica (U/g de massa seca) e de atividade específica aparente (U/g de proteína) obtidos utilizando-se os indutores óleo de oliva comercial e borra de milho podem ser observados na Tabela 15.

**Tabela 15.** Matriz do planejamento experimental de Plackett & Burman com seus níveis codificados e reais e com as respostas de atividade lipásica (U/gms) e específica aparente (U/g de proteína) para os indutores óleo de oliva e borra de milho, após 48h de fermentação.

Ensaio	Inóculo (esporos/g de meio)	VSSA (mL)	Aeração (vvm)	Indutor (%)	Ativ. Lipásica U/gms		Ativ. Específica U/g de proteína	
					Óleo de oliva	Borra de milho	Óleo de oliva	Borra de milho
1	+1(10 <sup>8</sup> )	-1(40)	+1(1,5)	-1(0,5)	85	77	1373	1871
2	+1(10 <sup>8</sup> )	+1(80)	-1(0,5)	+1(2,5)	129	99	2682	3831
3	-1(10 <sup>6</sup> )	+1(80)	+1(1,5)	-1(0,5)	128	99	4205	2260
4	+1(10 <sup>8</sup> )	-1(40)	+1(1,5)	+1(2,5)	109	129	2801	3155
5	+1(10 <sup>8</sup> )	+1(80)	-1(0,5)	+1(2,5)	144	106	3801	2928
6	+1(10 <sup>8</sup> )	+1(80)	+1(1,5)	-1(0,5)	<b>172</b>	176	<b>4946</b>	5345
7	-1(10 <sup>6</sup> )	+1(80)	+1(1,5)	+1(2,5)	147	144	3808	4038
8	-1(10 <sup>6</sup> )	-1(40)	+1(1,5)	+1(2,5)	108	79	2401	1661
9	-1(10 <sup>6</sup> )	-1(40)	-1(0,5)	+1(2,5)	143	151	4789	3578
10	+1(10 <sup>8</sup> )	-1(40)	-1(0,5)	-1(0,5)	161	139	3469	2578
11	-1(10 <sup>6</sup> )	+1(80)	-1(0,5)	-1(0,5)	148	<b>279</b>	4275	<b>7270</b>
12	-1(10 <sup>6</sup> )	-1(40)	-1(0,5)	-1(0,5)	92	277	2008	5194
13*	0(10 <sup>7</sup> )	0(60)	0(1,0)	0(1,5)	97	139	2671	2716
14*	0(10 <sup>7</sup> )	0(60)	0(1,0)	0(1,5)	113	128	3745	4048
15*	0(10 <sup>7</sup> )	0(60)	0(1,0)	0(1,5)	154	185	3740	4310

\*Pontos centrais

VSSA = volume de solução de sulfato de amônio

Os níveis mais altos de atividade lipásica U/gms foram obtidos com a adição de borra de milho quando comparado ao uso do óleo de oliva (Tabela 15), além disso, os melhores resultados de atividade foram obtidos nas condições que utilizavam a menor concentração deste resíduo (0,5%).

Nos ensaios contendo borra de milho como fonte indutora, a maior atividade lipásica (279 U/gms) foi obtida no ensaio 11 (0,5% de borra; 0,5 vvm de aeração; 80 mL (VSSA) e  $10^6$  esporos/g de meio), enquanto que a menor atividade (77 U/gms) foi obtida no ensaio 1 (0,5% de borra; 1,5 vvm de aeração; 40mL (VSSA) e  $10^8$  esporos/g de meio).

Estes resultados indicam que quando se eleva a aeração (ensaio 11: 0,5 vvm; ensaio 1: 1,5 vvm) pode haver um ressecamento do meio, e conseqüente perda de umidade, principalmente nas condições em que o teor de umidade já é mais baixo, o que prejudica a fermentação para produção da enzima. Além disso, com base nestes resultados, o VSSA adicionado ao meio, aparentemente, possui efeito positivo, provavelmente, porque a aeração é inversamente proporcional a umidade no meio de cultivo ao longo do processo fermentativo.

A menor atividade específica aparente (1661 U/g de proteína) foi observada no ensaio 8 (2,5% de borra, 1,5 vvm de aeração, 40 mL (VSSA) e  $10^6$  esporos/g de meio), enquanto que a maior atividade específica aparente (7270 U/g de proteína) também foi observada no ensaio 11.

A análise estatística dos resultados obtidos de atividade enzimática e de atividade específica aparente indicou que as variáveis aeração e concentração de borra de milho foram significativas ( $p < 0,1$ ), de forma negativa para a atividade enzimática, enquanto que para a atividade específica, nenhuma variável influenciou de forma significativa o processo (Tabela 16). Entretanto, apesar de não significativo, a concentração de indutor, aeração e inóculo apresentaram efeitos negativos, corroborando com os resultados obtidos para atividade lipásica. Esses resultados indicaram que a borra pode estar agindo como indutor, porém, as menores concentrações, como por exemplo, 0,5%, são as mais indicadas para a obtenção de atividade lipásica. Como a borra é um resíduo do refino de óleos, pode haver a presença de inibidores/contaminantes neste material, que em concentrações um pouco mais altas de borra (2,5%) estejam inibindo a síntese da enzima. Além disso, a presença da borra pode alterar a transferência de massa no meio, um dos principais problemas encontrados para a FES.

Santos (2012) concluiu que a produção de lipase de *A. niger* mutante em FES por 72 h na presença de 3,0% de borra de girassol, a atividade lipásica (201,8 U/gms) foi significativamente maior ( $p < 0,1$ ), quando comparado a ausência de indutor (182,35 U/gms). Neste caso, níveis mais elevados de borra (3%) contribuíram para a elevação da atividade lipásica.

**Tabela 16.** Estimativa dos efeitos de atividade lipásica (U/gms) e específica aparente (U/g de proteína) utilizando borra de milho como fonte indutora para a produção de lipase de *A. niger* por FES.

Atividade Lipásica (U/gms)				
Indutor	Borra de milho			
	Efeitos	Desvio padrão	t(10)	p
Média*	147,45	13,11	11,25	5,35509E-07
(1) Inóculo	-50,42	29,31	-1,72	0,1162
(2) VSSA	8,68	29,31	0,30	0,7731
(3) Aeração*	-57,92	29,31	-1,98	0,0764
(4) Indutor*	-56,72	29,31	-1,93	0,0818
Atividade Específica Aparente (U/g de proteína)				
	Efeitos	Desvio padrão	t(10)	p
Média*	3652,37	347,24	10,52	9,98344-07
(1) Inóculo	-715,45	776,44	-0,92	0,3785
(2) VSSA	1272,42	776,44	1,64	0,1323
(3) Aeração	-1174,88	776,44	-1,51	0,1612
(4) Indutor	-887,85	776,44	-1,14	0,2795

\* Fatores estatisticamente significativos (90% confiança).

Nos ensaios contendo óleo de oliva como fonte indutora, a maior atividade lipásica (172 U/gms) foi obtida no ensaio 6 (0,5% de óleo; 1,5 vvm de aeração; 80mL (VSSA) e  $10^8$  esporos/g de meio), enquanto que a menor atividade (85 U/gms) foi obtida no ensaio 1 (0,5% de óleo; 1,5 vvm de aeração; 40mL (VSSA) e  $10^8$  esporos/g de meio).

A menor atividade específica aparente (1373 U/g de proteína) foi observada no ensaio 1, enquanto que a maior (4946 U/g de proteína) foi observada no ensaio 6, corroborando os resultados obtidos para atividade lipásica.

Analisando-se os resultados obtidos, pode-se verificar que o aumento do volume de sulfato de amônio (VSSA) (comparação entre os ensaios 1 e 6) foi crucial para o aumento das atividades lipásica e específica aparente. Esta interpretação foi corroborada pela análise estatística, por meio da qual a variável VSSA mostrou ser significativa ( $p < 0,10$ ) de forma positiva, tanto para atividade específica como para a atividade enzimática (Tabela 17). Em contrapartida, as variáveis aeração e concentração de óleo de oliva não tiveram nenhuma influência significativa para a produção de lipase. Entretanto, os efeitos dessas últimas variáveis foram negativos, apesar de não significativos, para a produção de lipase, assim como ocorreu na produção da enzima contendo borra de milho (Tabela 16).

Resultados similares foram obtidos por Kamini et al. (1998) que estudaram diferentes fontes lipídicas para a produção de lipases por *Aspergillus niger*, e constataram que a adição de óleo de oliva não influenciou significativamente o processo de produção de lipases.

Martins et al. (2008) produziram lipase de *A. fumigatus* em colunas aeradas em FES por 120 horas de fermentação. Foi utilizado óleo de soja como fonte de carbono adicional e obtiveram atividade lipásica igual a 119,46 U/gms, valores inferiores aos obtidos no presente trabalho.

**Tabela 17.** Estimativa dos efeitos de atividade lipásica (U/gms) e específica aparente (U/g de proteína) utilizando óleo de oliva como fonte indutora para a produção de lipase de *A. niger* por FES.

Atividade Lipásica (U/gms)				
Indutor	Óleo de oliva			
	Efeitos	Desvio padrão	t(10)	p
Média*	128,81	6,89	18,70	4,14284E-09
(1) Inóculo	5,57	15,40	0,36	0,7254
(2) VSSA*	28,40	15,40	1,84	0,0950
(3) Aeração	-11,30	15,40	-0,73	0,4801
(4) Indutor	-1,03	15,40	-0,07	0,9478
Atividade Específica Aparente (U/g de proteína)				
	Efeitos	Desvio padrão	t(10)	p
Média*	3381,05	259,94	13,01	1,3643E-07
(1) Inóculo	-402,68	581,24	-0,69	0,5042
(2) VSSA *	1145,98	581,24	1,97	0,0769
(3) Aeração	-248,38	581,24	-0,43	0,6782
(4) Indutor	1,15	581,24	0,00	0,9985

\* Fatores estatisticamente significativos (90% confiança).

VSSA = volume de solução de sulfato de amônio

As matérias- primas são responsáveis por grande parte dos custos de produção de enzimas, podendo chegar até 70% dos custos gerados. Portanto, a utilização de diferentes resíduos e/ou coprodutos, como a borra de milho, nos processos fermentativos contribuem para agregar valor a estes materiais; tornando os processos menos onerosos e contribuindo para a minimização da poluição ambiental, que poderia ser causada caso os mesmos não fossem adequadamente disponibilizados.

Os melhores resultados de atividade lipásica foram obtidos com a adição de borra de milho quando comparado com a adição de óleo de oliva (Tabela 15). Dessa forma, o resíduo da indústria de refino do óleo, que tem valor de mercado inferior ao óleo de oliva, pode ser empregado em baixas concentrações para produção de lipases. Por estes motivos, foi escolhida a borra de milho para dar continuidade aos experimentos de melhoramento da produção de lipase, através do delineamento fatorial completo  $2^2$  com os níveis mais baixos (0,0; 0,5;1,0) tanto para aeração (vvm) como para a concentração de indutor (%).

### 5.2.2 Primeiro delineamento fatorial completo

Para alcançar as melhores condições da produção de lipases foi utilizado o delineamento fatorial completo com as variáveis significativas selecionadas no item 5.2.1: concentração de borra de milho e aeração. Foram mantidos 60 mL de sol. de sulfato de amônio (VSSA) e  $10^6$  esporos/g de meio em todos os ensaios, pois foram variáveis que não influenciaram de forma significativa o processo, dessa forma manter a concentração de inóculo em  $10^6$  é mais viável técnica e economicamente que mantê-la em  $10^8$ , o mesmo ocorre para o volume de solução de sulfato de amônio.

Como pode ser observado na Tabela 18, as maiores atividades lipásica (216 U/gms) e específica aparente (11392 U/g de proteína) foram obtidas no ensaio 4 (1,0% de borra, 1,0

vvm de aeração), enquanto que as menores atividades lipásica (81 U/gms) e específica (4352 U/g de proteína) foram obtidas no ensaio 3 (1,0% de borra e 0,0 vvm).

**Tabela 18.** Matriz para o delineamento fatorial completo  $2^2$  com seus níveis codificados e reais e com as respostas de atividade lipásica (U/gms) e específica aparente (U/g de proteína) para o indutor borra de milho, após 48h de fermentação.

Ensaio	Aeração (vvm)	Concentração de borra de milho (%)	Ativ. Lipásica U/gms	Ativ. Específica Aparente U/g de proteína
1	-1(0,0)	-1(0,0)	176	7318
2	+1(1,0)	-1(0,0)	189	7637
3	-1(0,0)	+1(1,0)	81	4352
<b>4</b>	<b>+1(1,0)</b>	<b>+1(1,0)</b>	<b>216</b>	<b>11392</b>
5*	0(0,5)	0(0,5)	137	5522
6*	0(0,5)	0(0,5)	170	5241
7*	0(0,5)	0(0,5)	170	5907

\*Pontos centrais.

Baseado nos resultados obtidos, verificou-se que a presença da aeração no sistema é importante para uma maior produção de lipase (comparação da variável entre o ensaio 3 e 4), enquanto a presença ou ausência de borra de milho não se mostrou fundamental para o processo (comparação entre todos os ensaios) (Tabela 18 e 19).

Na Tabela 19 estão representados os coeficientes de regressão e desvio padrão do primeiro planejamento fatorial completo ( $2^2$ ), para a atividade lipásica e específica aparente. O coeficiente de correlação obtido para atividade lipásica foi de 0,92. Em relação à análise estatística dos resultados de atividade lipásica, a variável aeração e a sua interação com a concentração de indutor foram estatisticamente significativas ( $p < 0,1$ ) de forma positiva a um nível de confiança de 90%, enquanto o efeito das variáveis principais e sua interação não foram significativas para a atividade específica (Tabela 19). Estes dados corroboram a discussão feita nos parágrafos anteriores, com base nos dados reais de atividade obtidos.

**Tabela 19.** Coeficiente de regressão e desvio padrão do primeiro planejamento fatorial completo ( $2^2$ ), para a atividade lipásica (U/gms) e específica aparente (U/g de proteína).

Atividade Lipásica (U/gms)				
	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t(3)	p
Média/Inter.*	162,5	6,14	26,48	0,000118
(1)Aeração*	37,05	8,12	4,56	0,019719
(2)Concentração	-17,05	8,12	-2,10	0,126494
1 x 2*	30,4	8,12	3,75	0,033222
Atividade Específica Aparente (U/g de proteína)				
	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t(3)	p
Média/Inter.*	6767	613,93	11,02	0,001599
(1) Aeração	1839,7	812,15	2,27	0,108401
(2) Concentração	197,45	812,15	0,24	0,823587
1 x 2	1680,15	812,15	2,07	0,130395

\* Variáveis estatisticamente significativas (90% confiança).

A fim de verificar se o modelo estatístico obtido é adequado para descrever os dados e construir a curva de contorno e superfície de resposta pertinente a produção da lipase, foi realizada a análise de variância (ANOVA) conforme apresentado na Tabela 20.

**Tabela 20.** Análise de variância do primeiro delineamento fatorial completo  $2^2$  para atividade lipásica de *A. niger*.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado
Regressão	9187,45	2	4593,725	9,41
Resíduos	1953,39	4	488,3475	
Total	11140,84	6		

F tabelado  $(2;4) = 4,32$ ;  $R^2 = 0,929$ .

Com os resultados da ANOVA (Tabela 18) verificou-se que o F calculado (9,41) para a regressão foi maior que o F tabelado (4,32), portanto, validou-se o ( $p < 0,1$ ) modelo e pôde-se obter a equação de segunda ordem (equação 7) que representa a atividade lipásica U/gms em relação aos valores concentração do indutor e aeração.

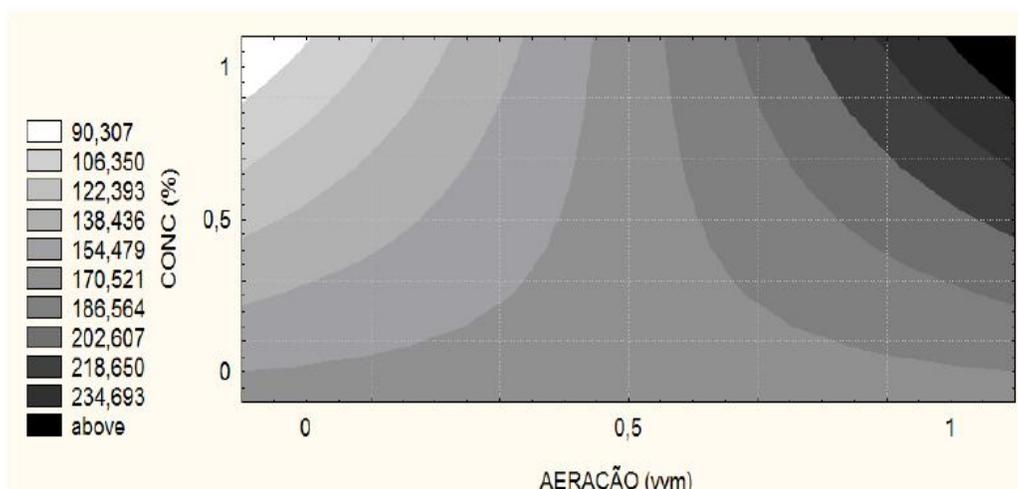
$$\text{Atividade lipásica U/gms} = 162,5 + 37,05A + 30,4A * C \quad (\text{Eq.7})$$

Onde:

A = aeração

C = concentração do indutor

Como o modelo definido para a atividade lipásica foi validado, pôde-se construir a curva de contorno em função das variáveis: concentração de indutor e aeração (Figura 7).



**Figura 7.** Curva de contorno para atividade lipásica U/gms

Analisando-se a curva de contorno do planejamento fatorial completo (Figura 7), pode-se verificar que as maiores atividades lipásicas foram obtidas em níveis superiores de aeração e concentração de borra de milho. Portanto, dentre as condições estudadas, a melhor condição para a produção de lipase de *A. niger* em FES foi observada no ensaio 4 ( $10^6$  de inóculo; 1 vvm de aeração; 1% de borra e 60 mL de sol. de sulfato de sódio) com atividade lipásica de 216 U/gms. Entretanto, o ensaio 2 ( $10^6$  de inóculo; 1 vvm de aeração; 60 mL de sol. de sulfato de sódio e sem adição de borra) também apresentou uma atividade lipásica elevada (189 U/gms), sugerindo que a presença de borra possa ser dispensável. Além disso, resultados obtidos revelaram a presença de aproximadamente 3,55% de lipídeos no farelo de trigo, substrato utilizado para a produção de lipase, dessa forma, pode ter ocorrido a indução da produção de lipase, mesmo na ausência de borra, causada pela presença destes lipídeos do farelo.

Com base nos resultados obtidos no planejamento de Plackett & Burman (5.2.1) e no de planejamento fatorial completo (5.2.2), provavelmente, o melhor valor de atividade deve estar entre 1,0 e 1,5 vvm de aeração e 1 a 2% de borra, no entanto, em virtude do equipamento rotâmetro que estabelece o volume de ar por volume de meio por minuto, não possui sensibilidade que possibilite avaliar valores dentro desta faixa, a condição de ensaio 4 do planejamento fatorial completo foi utilizada nos próximos experimentos a serem detalhados nos itens 5.3; 5.4 e 5.5.

Para fins informativos e comparativos, na Tabela 21 estão apresentados os resultados de atividade lipásica (U/mL) do primeiro delineamento fatorial completo, onde a maior atividade obtida foi de 47 U/mL.

**Tabela 21.** Atividade lipásica (U/mL) dos ensaios do primeiro fatorial completo.

Ensaio	Ativ. Lipásica U/mL
1	37
2	40
3	17
4	47
5*	30
6*	36
7*	36

\*Pontos centrais

Resultados superiores foram encontrados no presente trabalho (47 U/mL) (Tabela 21), quando comparado com outros autores (CASTILHO et al., 2000; GOMES e FREIRE, 2012; SALIHU et al., 2011; POKORNY, CIMERMAN e STEINER, 1997; DUTRA et al., 2008), cujos trabalhos serão detalhados a seguir:

Castilho et al. (2000) compararam a produção de lipases fúngicas de *Penicillium restrictum* por FES (torta de babaçu e 2 % óleo de oliva) e por FS (peptona de carne, extrato de leveduras e óleo de oliva). Os autores verificaram uma menor atividade lipolítica na FES (5,8 U/mL em 24 h) em relação à FS (17 U/mL em 64 h), mas com níveis de produtividades semelhantes na FES (0,24 U/mL/h) e na FS (0,26 U/mL/h).

Gomes e Freire (2012) realizaram um estudo com objetivo de avaliar as condições de cultivo, em fermentação submersa para a produção de lipases pelo fungo *Penicillium restrictum*, tendo o seguinte meio (p/v): peptona de carne 2,0%; extrato de levedura 0,1%; óleo de oliva 1,0%; NaCl 0,5%; pH 5,5. O óleo de oliva (fonte de carbono) foi substituído por triacilgliceróis, ácidos graxos e Tween 80, enquanto a peptona (fonte de nitrogênio) foi substituída por milhocina. Os experimentos foram realizados a 30°C em frascos agitados. Os pesquisadores observaram que o óleo de milho foi a melhor fonte de carbono (C/N=5,0), resultando em 24 U.mL<sup>-1</sup>; 3,5 U.mg<sup>-1</sup>; 0,333 U.mL<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (atividade lipásica máxima, rendimento específico e produtividade, respectivamente). A milhocina (fonte de nitrogênio) não apresentou bons níveis de atividade lipásica.

Salihu et al. (2011) produziram lipase de *Candida cylindracea* em fermentação submersa (FS) utilizando o efluente da indústria de óleo de palma como um dos meios de fermentação. Os autores obtiveram atividade máxima de 20,26 U/mL.

Pokorny, Cimerman e Steiner (1997) utilizaram *Aspergillus niger* MZKI A1 16 para produzir enzimas lipolíticas em fermentação submersa (FS). A produção de lipase foi induzida pela adição de azeite a um meio complexo com um pH inicial de 5,0. Atividade máxima (5,0 U/mL) foi atingida após 70 h, em biorreator a 30°C.

Dutra et al. (2008) produziu lipase de *A. niger* mutante 11T53A14 em FES por 96 horas utilizando óleo de mamona e farelo de trigo e obtiveram atividade inferior (23,7 U/mL) a encontrada no presente trabalho (Tabela 21).

### 5.2.3 Segundo delineamento fatorial completo

Um segundo delineamento fatorial completo foi realizado com o intuito de confirmar os resultados obtidos no primeiro planejamento fatorial, pois foi necessário utilizar um novo

lote de borra de milho para o desenvolvimento da tese. Além disso, os resultados que serão abordados a seguir foram obtidos em um outro laboratório, com outros equipamentos, dessa forma, apesar dos resultados terem seguido a mesma tendência do primeiro fatorial completo, sabe-se que o ideal é manter as condições de análise idênticas para que se tenha reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados.

Os resultados obtidos revelaram que a maior atividade lipásica (330 U/gms) e específica aparente (6362 U/g de proteína) foram obtidas novamente no ensaio 4 (1,0% de borra, 1,0 vvm de aeração, 60mL de SSA e  $10^6$  esporos/g de meio), enquanto que a menor atividade lipásica (4,7 U/gms) foi obtida no ensaio 1 (sem adição de borra e sem aeração) (Tabela 22). Entretanto, durante a fermentação, a coluna que continha o meio referente ao ensaio 1 apresentou um vazamento e encheu-se de água, isso explicaria a baixa atividade lipásica encontrada (4,7 U/gms). Apesar do problema apresentado no ensaio 1, o resultado mais importante para o trabalho, que se trata da maior produção da enzima, foi a confirmação de que o ensaio 4 (1,0% de borra, 1,0 vvm de aeração) com valores de atividade ainda maiores (330 U/gms) que no primeiro fatorial completo (216 U/gms), manteve-se como a melhor condição experimental. Dessa forma, a tendência de produção de lipase de *A. niger* encontrada em ambos os delineamentos fatoriais completos (primeiro e segundo) foram similares.

Apesar de ambos os delineamentos terem apresentado a mesma tendência, ou seja, o ensaio 4 com a maior atividade lipásica, achou-se prudente realizar um terceiro delineamento fatorial completo, entretanto, os resultados obtidos nos pontos centrais foram muito díspares, não apresentando correlação adequada entre os dados, dessa forma, não foram apresentados no presente trabalho.

**Tabela 22.** Matriz para o segundo delineamento fatorial completo  $2^2$  com seus níveis codificados e reais e com as respostas de atividade lipásica U/gms e específica aparente U/g de proteína para o indutor borra de milho, após 48h de fermentação.

Ensaio	Aeração (vvm)	Concentração de borra de milho (%)	Ativ. Lipásica U/g massa seca	Ativ. Específica Aparente U/g de proteína
1	-1(0,0)	-1(0,0)	4,7	687
2	+1(1,0)	-1(0,0)	190	4952
3	-1(0,0)	+1(1,0)	171	3028
<b>4</b>	<b>+1(1,0)</b>	<b>+1(1,0)</b>	<b>330</b>	<b>6362</b>
5*	0(0,5)	0(0,5)	133	2582
6*	0(0,5)	0(0,5)	141	2808
7*	0(0,5)	0(0,5)	196	3364

\*Pontos centrais

### 5.3 Produção de Lipases com Distintas Borrás alcalinas

Com o intuito de avaliar a capacidade de outras borras induzirem a produção de lipase, foram realizados ensaios utilizando-se as borras de girassol e canola, além da própria borra de milho utilizada no segundo fatorial completo. Ensaio na ausência de indutor também foram realizados. A idéia de se testar esta condição surgiu com base nos resultados obtidos no planejamento fatorial completo (5.2.2), que mostraram que a concentração do indutor, na faixa estudada (0; 0,5 e 1,0), não foi significativa para produção da lipase. Além disso, foram

obtidos valores elevados de atividade lipásica (189 U/gms) (Tabela 18) mesmo na ausência de indutor.

A condição de processo selecionada como a mais produtiva no planejamento fatorial (5.2.2) foi mantida para esta etapa do trabalho. Nesta condição, as variáveis concentração de inóculo, aeração, concentração de indutor e VSSA, a saber:  $10^6$  esporos por grama de meio; 1 vvm de aeração; 1% de borra e 60 mL de SSA, respectivamente, foram mantidas constantes, exceto pelo ensaio que não continha borra, no qual não havia a presença do indutor. Os experimentos foram conduzidos por 48 horas e realizadas 4 repetições em triplicata, para cada uma das condições testadas.

Os valores de atividades lipásicas U/gms, atividade específica aparente U/g de proteína e das atividades proteásicas U/mL, e suas respectivas médias estão apresentados na (Tabela 23).

**Tabela 23.** Médias da produção de lipase em 48 h utilizando as diferentes borras de refino de óleo e os resultados do Teste de Tukey.

INDUTORES	Atividade lipásica U/gms*	Atividade específica aparente U/g de proteína*	Atividade proteásica U/mL*
Sem borra	254,4a	7570,7a	7,3a
Borra de girassol	221,8ab	6357,0bc	6,9a
Borra de canola	216,1ab	6603,9b	6,8a
Borra de milho	191,9b	5558,7c	7,8a
Diferença mínima significativa	DMS: 40,23	DMS: 916,3	DMS: 1,29

\*Valores médios de 4 repetições em triplicata. Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ( $p < 0,1$ ).

Verificou-se que a maior atividade lipásica (254 U/gms) foi obtida na ausência do indutor, entretanto, quando comparado com a adição de borra de canola (216 U/gms) e de borra de girassol (222 U/gms), não houve diferenças significativas entre os resultados. Entretanto, quando comparado com a adição de borra de milho (192 U/gms), a atividade na ausência de indutor foi significativamente maior ( $p < 0,1$ ).

Para a atividade específica aparente foram obtidas atividades significativamente maiores ( $p < 0,1$ ) (7571 U/g de proteína) para a condição de ausência de indutor, quando comparado com a adição de borra de girassol (6357 U/g de proteína), canola (6604 U/g de proteína) e de milho (5559 U/g de proteína). Não houve diferenças significativas ( $p < 0,1$ ) entre as atividades proteásicas na ausência (7,3 U/mL) e na presença de indutores: borra de milho (7,8 U/mL), borra de girassol (6,9 U/mL) e borra de canola (6,8 U/mL).

Os dados obtidos indicaram que todas as borras testadas tem potencial para serem utilizadas como indutoras, uma vez que possibilitaram a obtenção de resultados próximos quando comparados com as atividades na ausência de borra. Entretanto, verificou-se que elas são dispensáveis ao processo de obtenção da lipase com o microrganismo utilizado, *A. niger* e nas condições avaliadas no presente trabalho. Fato este animador, uma vez que torna ainda menos onerosa a obtenção da enzima.

Sugere-se que a quantidade de lipídeos (3,55%) encontrada no farelo de trigo, uma das matérias-primas da fermentação (item 5.1), tenha sido suficiente para agir como indutor da produção de lipase, mesmo não sendo este lipídeo tão disponível quanto aquele que está presente quando a borra é adicionada ao meio de cultivo (Tabela 8).

Uma outra hipótese, é que com o passar do tempo, as borras possam sofrer uma série de reações químicas e, conseqüentemente, alterações de textura e composição de nutrientes.

Esta hipótese, explicaria em parte os resultados obtidos nos planejamentos (itens 5.2.2 e 5.2.3) por terem sido melhores com a borra de milho do lote mais recente, e em fermentações posteriores a sua presença ter sido dispensável (item 5.3).

Santos (2012) realizou a caracterização das borras utilizadas no presente trabalho e obteve os seguintes resultados (Tabela 8): a borra de girassol apresentou o maior teor de resíduo de sabão (47,5%), seguido da borra de canola (39,3%) e de milho (31,8%). A borra de girassol apresentou maior teor de sódio (2,8%). Segundo relato de Damaso et al. (2008) a presença de cátions é fator benéfico para o crescimento fúngico e, conseqüentemente, produção da enzima.

Segundo Mag, Green e Kwong, (1983) dentre os inúmeros componentes que compõem as borras alcalinas, de 5-30% é constituído por lipídeos e desse material, a maior parte (60-70%) está na forma de sabões de sódio de ácidos graxos.

As borras de girassol e de milho apresentaram predominância nos ácidos graxos linoléico (42,6% e 42,7%, respectivamente) e oléico (33,2% e 37,4%, respectivamente), já a borra de canola apresentou predominância dos ácidos graxos oléico (57,19%), seguido pelo linoléico (12,0%) e por último o palmítico (6,6%). De acordo com Wang, Xu e Shan (2008), o ácido graxo linoléico proporciona aumento na atividade lipásica, a qual pode ser significativamente maior na presença do ácido oléico.

Resultados de caracterização das borras alcalinas obtidos por Santos (2012) descrito no item 4.8, pouco explica os resultados obtidos no presente trabalho, uma vez que a melhor condição foi na ausência de borra, contradizendo os resultados obtidos por este autor, que estudou a produção de lipase de *A. niger* 11T53A14, uma linhagem mutante, com três borras distintas: milho, canola e girassol, além da ausência de borra e verificou que a maior atividade lipásica (201,81 U/gms) ( $p < 0,1$ ) foi obtida na presença de 3% de borra de girassol.

A produção de lipases em FES utilizando resíduos gerados no refino de óleos vegetais foi relatado por Navarro et al. (2011). As lipases foram produzidas por um consórcio microbiano obtido a partir de uma mistura de lamas de águas residuais e estudadas em meio contendo resíduos sólidos industriais ricos em gorduras, em condições termofílicas, com temperatura acima de 45°C por 35 dias. Os autores observaram que em 14 dias de fermentação obtiveram 120 U/gms, resultados inferiores aos obtidos no presente trabalho e após este período houve um decréscimo de atividade.

Contesini et al. (2009) estudou a produção de lipase de *A. niger* em FES e obteve atividade de 33,03 U/g, resultados estes, inferiores aos obtidos no presente trabalho.

Dantas e Aquino (2010) obtiveram máxima atividade enzimática de 25 U/g empregando torta de babaçu e 20 U/g empregando borra de café, resultados estes, menores que os obtidos no presente trabalho. Palma et al. (2000) estudaram a produção de lipases de *Penicillium restrictum* por (FES) e constataram que a maior atividade lipásica (27,8 U/g) foi obtida com torta de babaçu enriquecido com peptona. Resultados superiores foram obtidos no presente trabalho com a utilização de borras oriundas do refino de óleos.

Colla et al. (2010), estudaram a produção de lipases de *Aspergillus* sp. em FES e em FS com o objetivo de comparar os resultados de processo. Resultados obtidos pelos autores revelaram que a atividade lipolítica máxima obtida na FS foi de 4,52 U, enquanto que na FES foi de 25,07 U.

Damaso et al. (2008) utilizaram diferentes fontes indutoras para a produção de lipases de *Arpergillus niger* mutante 11T53A14 em fermentação semi-sólida. Segundo os autores, os melhores resultados foram obtidos com a utilização de borra de milho e estearina, atingindo valores de 62,7 e 37,7 U/g, respectivamente.

Mala et al. (2007) estudaram diferentes combinações de indutores para a produção de lipases de *Arpergillus niger* em fermentação semi-sólida. Segundo os autores, a associação de

farelo de trigo e de resíduo agroindustrial torta do óleo de gergelim na proporção 3:1, umedecidos com água, possibilitou a obtenção de atividade lipásica de 384 U/g.

Mahanta, Gupta e Khare (2008) estudaram a produção de lipase de *Pseudomonas aeruginosa* em FES por 120 h, utilizando como substrato torta de semente de pinhão manso com 50% de umidade. Os autores encontraram valores elevados de atividade lipásica (625 U/gms).

#### **5.4 Cinética de Produção da Lipase Utilizando Borra de Canola e na Ausência de Indutor**

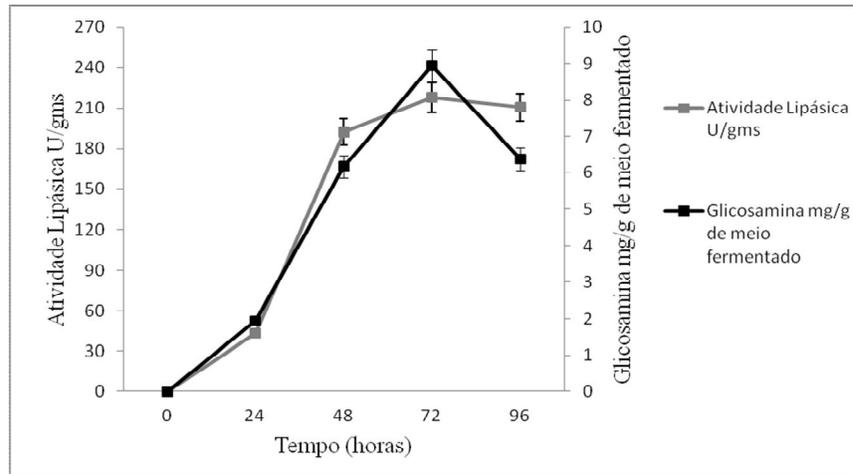
A cinética foi realizada com o intuito de identificar o tempo ótimo da produção de lipase de *A. niger* e de maior produtividade, nas condições melhoradas obtidas no planejamento fatorial completo  $2^2$  ( $10^6$  de inóculo; 1 vvm de aeração e 60 mL de SSA). O estudo foi conduzido na ausência de borra, pois com base nos resultados obtidos no item 5.3, a borra é dispensável para o processo de obtenção da enzima. Além disso, foi realizada a cinética contendo 1% de borra de canola, pois apesar de apresentar atividades inferiores aos ensaios na ausência de borra, a diferença entre os valores de atividade obtidos não foi significativa ( $p < 0,1$ ) (Tabela 23).

A borra de canola apresentou uma atividade inferior (216 U/gms) quando comparada com a borra de girassol (221 U/gms), entretanto, a diferença não foi significativa ( $p < 0,1$ ) (Tabela 23). Dessa forma, escolheu-se a borra de canola para realizar a cinética de produção, principalmente devido à borra de girassol ter apresentado mudanças visíveis de textura e de cor durante a estocagem. Portanto, como a borra de canola estava com suas características mais próximas das originais e com atividade lipásica semelhante a borra de girassol, achou-se mais prudente utilizá-la para este teste.

Nas Figuras 8 e 9 podem ser observados os valores de atividade lipásica (U/gms) e glicosamina (mg/gms) na ausência de borra e na presença de borra de canola respectivamente, em função do tempo de fermentação.

Utilizou-se a quantificação de glicosamina para determinar a estimativa de biomassa presente no meio. Esta análise baseia-se na medição do n-acetil-D-glicosamina, que é o monômero da quitina, um polissacarídeo presente na parede celular dos fungos.

Observando-se a Figura 8, verificou-se que o crescimento máximo do fungo ocorreu em aproximadamente 72 horas de fermentação, porém, apesar da maior atividade lipásica ter sido obtida com 72 horas de fermentação (218 U/gms) a maior produtividade foi observada com 48 horas de processo (4 U/gms.h). Como o comportamento da atividade lipásica e glicosamina foram semelhantes, sugere-se que a produção da enzima seja associada ao crescimento de *A. niger*.

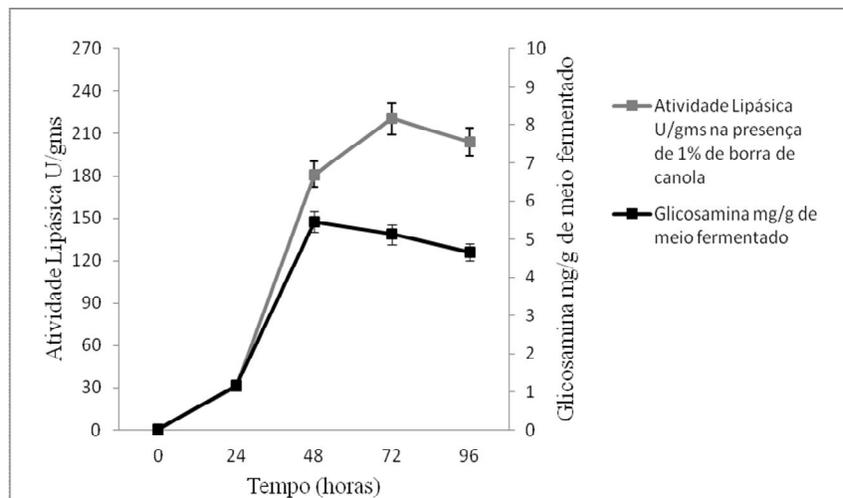


**Figura 8.** Perfil cinético da produção de lipase de *A. niger* em FES na ausência de borra.

Este resultado é bastante animador, principalmente para produções futuras em larga escala onde poderão ser economizados energia e tempo de processo, pois em poucas horas de fermentação (48h) consegue-se a maior produtividade (4 U/gms.h) na obtenção de lipase, com elevada atividade na ausência de borra (192 U/gms). Além disso, coincidentemente, a produção da enzima foi realizada desde o início do trabalho com 48 horas de fermentação, pois foi observado que a linhagem de *A. niger* utilizada no presente trabalho cresce rapidamente neste intervalo de tempo. Com o estudo de cinética, ficou confirmado que 48 h trata-se do melhor tempo para avaliação do processo, com o microrganismo em questão.

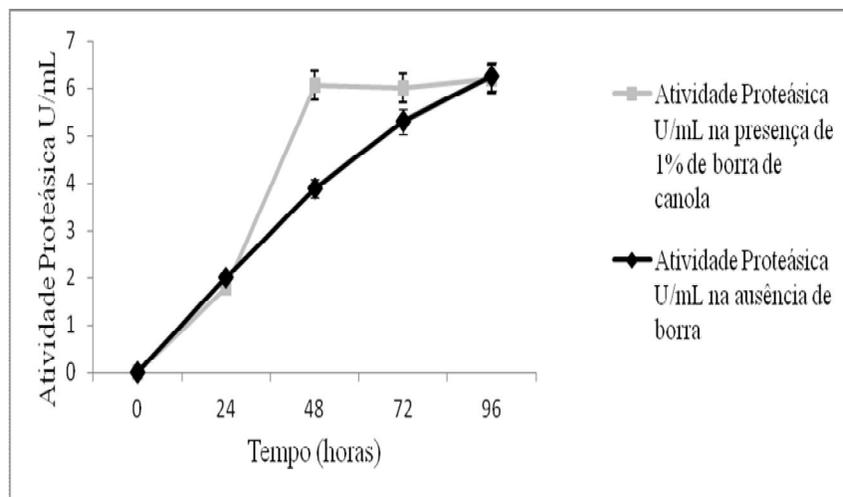
Comparando os resultados obtidos no presente trabalho com os resultados de outros autores (Tabela 5), pode-se observar que a atividade lipásica de *A. niger* (192 U/gms) e produtividade (4 U/gms.h) foram superiores a maioria dos resultados obtidos pelos autores; 24,6 U/gms e 0,25 U/gms.h (DANTAS e AQUINO, 2010); 62,7U/gms e 1,3 U/gms.h (DAMASO et al., 2008) e 25,07 U e 0,26 U/gms.h (COLLA et al., 2010). Este resultado torna o uso da espécie de *A. niger* estudada no presente trabalho extremamente atrativa, pois em tempo reduzido de fermentação (48 h) valores elevados de atividade lipásica foram observados, consequentemente, menor gasto com energia foi despendido.

O perfil cinético da fermentação na presença de 1% de borra de canola apresentado na Figura 9 foi semelhante ao perfil encontrado na ausência de borra. A maior produtividade foi observada também com 48 horas (3,75 U/gms.h), com uma atividade lipásica de 181 U/gms. Como o comportamento da atividade lipásica e glicosamina foram semelhantes, sugere-se que a produção também seja associada ao crescimento de *A. niger*.



**Figura 9.** Perfil cinético da produção de lipase de *A. niger* em FES na presença de 1% de borra de canola.

Além da cinética, foi realizado o acompanhamento da produção de proteases durante a produção de lipase de *A. niger* na ausência de borra de canola e na presença de 1% deste indutor. As proteases possuem a capacidade de hidrolisar proteínas, o que pode acarretar na diminuição da estabilidade das enzimas com o decorrer do tempo. Na Figura 10, podem ser observados os resultados de protease expressos em U/mL, ao longo do estudo cinético.



**Figura 10.** Perfil cinético da produção de protease no extrato enzimático em FES na presença de 1% de borra de canola e sem indutor.

Verificou-se que o perfil de produção de protease foi aumentando proporcionalmente ao tempo de fermentação, tanto na ausência de borra quanto na presença de borra de canola (Figura 10). Ao contrário do observado para a atividade lipásica, onde ocorreu uma queda com 96 horas de fermentação (Figuras 8 e 9).

Foi observado que com 48 horas de fermentação, tempo de maior produtividade, a atividade proteásica foi menor do que no tempo de 72 horas, tanto na presença de borra, quanto na ausência de indutor. Foram observados valores de aproximadamente 6 U/mL na

presença de borra de canola e 4 U/mL, na ausência de borra. Portanto, a fermentação na ausência de borra gera melhores resultados para manter a atividade lipásica, uma vez que quanto maior a quantidade de protease maior o risco desta enzima hidrolisar a lipase.

### 5.5 Concentração do Extrato Enzimático

A purificação de lipases tem, em geral, dois objetivos básicos: obtenção da enzima virtualmente pura, para melhor estudo de suas características bioquímicas e de sua estrutura e obtenção de um produto com maior atividade específica (unidades de atividade/mg de proteína) para aplicação em diversos processos. Entretanto, processos de purificação costumam elevar consideravelmente o preço do produto final. Normalmente os protocolos de purificação de enzimas microbianas extracelulares são separados em duas etapas: pré-purificação e purificação por métodos cromatográficos (PALEKAR, VASUDEVAN e YAN, 2000).

O extrato enzimático foi submetido à concentração/pré-purificação através da técnica de precipitação por sulfato de amônio em quatro condições de saturação: 40, 60, 80 e 90%. Adicionalmente, a técnica de liofilização também foi avaliada para concentração da lipase. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 24.

**Tabela 24.** Avaliação da recuperação enzimática e do fator de purificação obtidos para a técnica de concentração por precipitação com sulfato de amônio a 40, 60, 80 e 90% de saturação e pela técnica de liofilização.

Tratamento	Atividade		Recuperação % (RA) <sup>2</sup>	Fator de Purificação (FP) <sup>3</sup>
	Lipásica U/mL	Atividade Específica U/g de proteína <sup>1</sup>		
40%	14	71323	18	1,8
60%	38	9662	26	2,5
80%	40	4901	31	1,2
90%	47	5423	38	1,3
Liofilização	94	2158	61	-

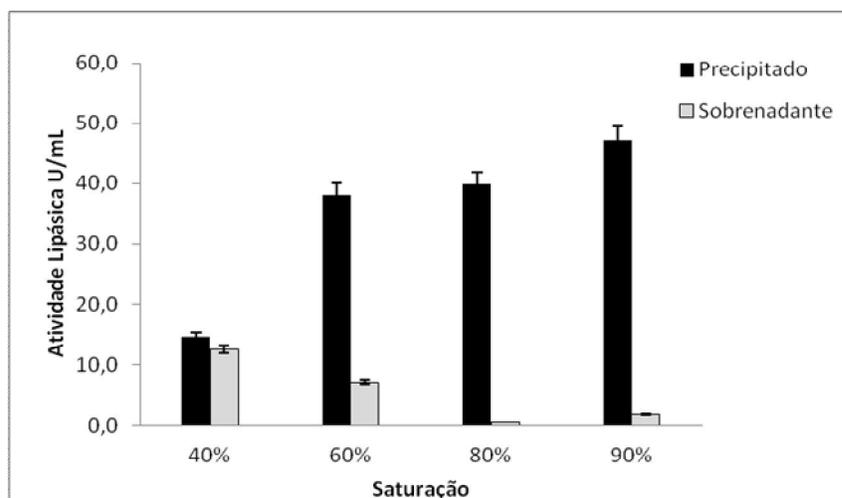
\*Os resultados são médias de 2 repetições.

<sup>1</sup> Calculada pela razão entre atividade enzimática U/mL pela massa de proteína.

<sup>2</sup> Calculado conforme equação 4, item (4.19.1)

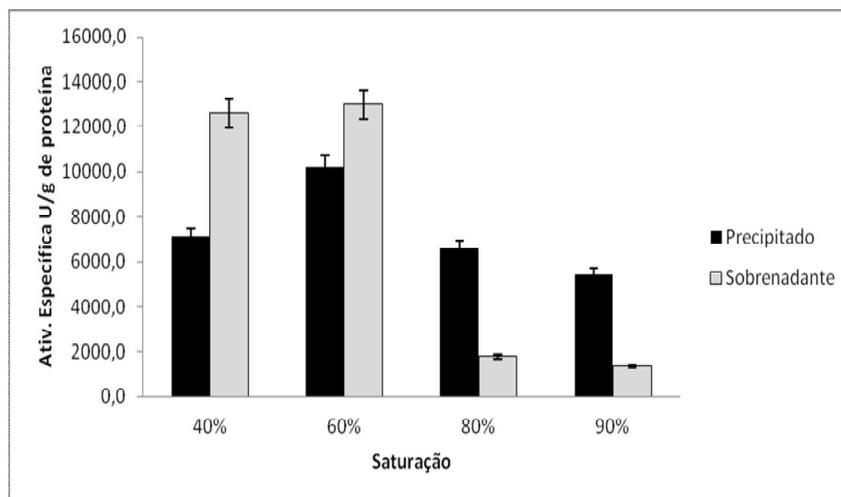
<sup>3</sup> Calculado conforme equação 5, item (4.19.1)

Analisando os resultados de atividade lipásica U/mL, o maior valor obtido (47 U/mL) foi a 90% de saturação, nesta condição foi observada também a melhor taxa de recuperação (38 %) (Tabela 24 e Figura 11).



**Figura 11.** Atividade lipásica (U/mL) dos sobrenadantes e do precipitado para as condições de 40, 60, 80 e 90% de saturação.

Com 60% de saturação, observou-se maior atividade específica (9662 U/g de proteína) e maior fator de recuperação (2,52). A alta atividade específica foi devido a baixa concentração de proteína total no precipitado uma vez que foi encontrado também alta atividade específica no sobrenadante (Figura 12). Este resultado é bastante favorável quando se pretende purificar a enzima, porém, para a caracterização bioquímica da lipase optou-se em usar o precipitado obtido a 90% de saturação. Além disso, as Figuras 11 e 12 mostram que a concentração em 60% parece não ter sido eficiente, pois muita enzima ainda ficou no sobrenadante, principalmente em termos de atividade específica (Figura 11). Com base nos resultados obtidos, verificou-se que a concentração por sulfato de amônio a 90% foi a melhor condição.



**Figura 12.** Atividade específica U/g de proteína dos sobrenadantes e do precipitado para as condições de 40, 60, 80 e 90% de saturação.

A liofilização aparentemente foi a melhor técnica, pois obteve-se uma alta recuperação da enzima (61 %) e alta atividade lipásica (94 U/mL). Entretanto, não houve um aumento proporcional da atividade enzimática (4,0 vezes) em relação a diminuição do volume, que foi de 6,4 vezes. Provavelmente, nas etapas de congelamento e descongelamento do extrato

durante a liofilização, que não foi feita de forma contínua, possa ter contribuído com a perda de atividade. A técnica de liofilização tem a finalidade de apenas concentrar e não pré-purificar a enzima. Como pode ser observado na Tabela 24, o resultado de atividade específica do extrato enzimático liofilizado foi inferior aos resultados obtidos com a técnica de precipitação com sulfato de amônio.

Mhetras, Bastawde e Gokhale (2009) realizaram a pré-purificação de lipase de *Aspergillus niger* NCIM 1207 por precipitação com sulfato de amônio a 90% e posterior purificação por cromatografia em gel. Na etapa de pré-purificação os autores obtiveram atividade específica de 39,47 U/mg de proteína e recuperação de 99,05% e ao final da purificação observou atividade de 1373.13 U/mg de proteína e recuperação final de 54%.

Pastore et al. (2003) realizaram a precipitação de lipase de *Rhizopus* sp. com 70% de saturação e alcançaram 103 U/mg de proteína. Abbas et al. (2002) realizaram a precipitação de lipases de *Mucor* sp. com 75% de saturação e observaram 129 U/mg de proteína.

Benjamin e Pandey (2001) realizaram a precipitação de lipase de *Candida rugosa* de 20% a 100% de saturação com sulfato de amônio e obtiveram 3,88 U/mg de proteína.

## 5.6 Caracterização Bioquímica da Lipase

### 5.6.1 Determinação da temperatura e pH ótimos

O estudo das propriedades bioquímicas das enzimas é de suma importância para conhecer as particularidades de atuação enzimática e destina-la a aplicação industrial mais adequada. O conhecimento da temperatura e pH ótimo é uma das primeiras características a serem investigadas para poder contribuir com o sucesso dos bioprocessos.

No presente trabalho foi utilizado delineamento composto central rotacional (DCCR 2<sup>2</sup>) para determinação concomitante da temperatura e pH ótimos da lipase de *A. niger*. Os resultados podem ser observados na Tabela 25.

**Tabela 25.** Matriz do delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup> com seus níveis codificados e reais da avaliação da temperatura e pH ótimos na atividade lipásica de *A. niger*.

Variáveis			
Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Atividade Lipásica U/mL
1	-1(37)	-1 (3,6)	35
2	+1(73)	-1 (3,6)	13
3	-1 (37)	+1 (7,3)	27
4	+1 (73)	+1 (7,3)	0,5
5	-1,41 (30)	0 (5,6)	34
6	+1,41 (80)	0 (5,6)	0,8
7	0 (55)	-1,41 (3,0)	31
8	0 (55)	+1,41 (8,0)	5,0
9*	0 (55)	0 (5,6)	29
10*	0 (55)	0 (5,6)	28
11*	0 (55)	0 (5,6)	29
12*	0 (55)	0 (5,6)	29

\*Pontos centrais

Os dados de atividade lipásica foram inseridos no programa computacional Statistica e os resultados dos coeficientes de regressão e desvio padrão com 5% de significância estão apresentados na Tabela 26.

**Tabela 26.** Coeficientes de regressão e desvios padrão do planejamento fatorial composto central rotacional  $2^2$  da avaliação da temperatura e pH ótimos na atividade lipásica (U/mL) de *A. niger*.

	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	t(6)	p
Média*	28,84652	1,242859	23,20981	4,19E-07
(1) Temperatura (L)*	-11,9221	0,880152	-13,5455	1E-05
Temperatura (Q)*	-5,33117	0,98668	-5,40314	0,001659
(2) pH (L)*	-7,24464	0,880152	-8,23112	0,000174
pH (Q)*	-5,08747	0,98668	-5,15615	0,002103
1L x 2L	-1,3645	1,24287	-1,09786	0,314357

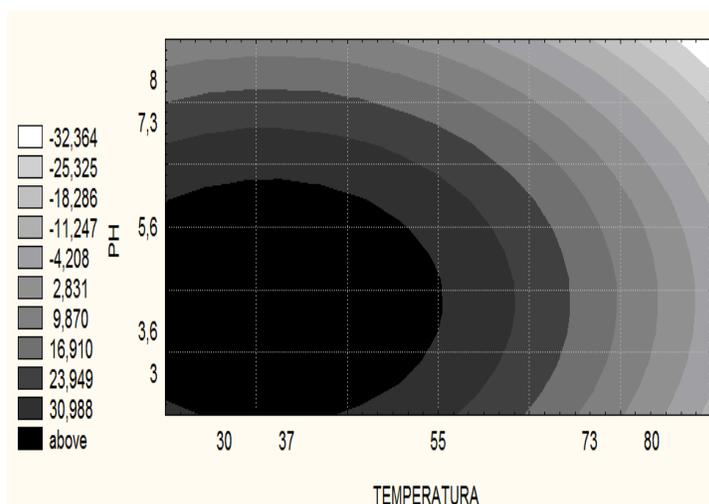
\* Fatores estatisticamente significativos (95% confiança).

Os resultados obtidos revelaram que todas as variáveis, exceto a interação entre pH e temperatura, foram significativas de forma negativa a um nível de confiança de 95% (Tabela 26). Através da análise de variância (ANOVA), conforme apresentado na Tabela 27, obteve-se um F calculado (72,3) 24,4 vezes maior que o F tabelado ( $F = 2,96$ ), portanto, validou-se estatisticamente o modelo ( $p < 0,05$ ) e permitiu a construção da curva de contorno (Figura 13).

**Tabela 27.** Análise de variância da temperatura e pH ótimos na atividade lipásica de *A. niger*.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado
Regressão	1840,28	4	460,07	72,33
Resíduo	44,52	7	6,36	
Total	1884,8	11		

F tabelado  $(4;7) = 2,96$ ;  $R^2 = 0,980$



**Figura 13.** Curva de contorno para a atividade lipásica de *A. niger* em função das variáveis temperatura e pH.

O coeficiente de correlação obtido para este planejamento foi de 0,980. Após a validação do modelo através da ANOVA, pôde-se obter o modelo de segunda ordem (equação 8) que representa a atividade lipásica em relação aos valores de temperatura e pH.

$$\text{Ativ. (U/ml)} = 28,84652 - 11,9221T - 5,33117T^2 - 7,24464\text{pH} - 5,08747\text{pH}^2 \quad \text{Eq. (8)}$$

De posse do modelo de segunda ordem (Eq. 8), foi possível calcular a temperatura e o pH ótimos como sendo, respectivamente, 36°C e 4,0. Após a obtenção dos resultados, foi realizada a repetição do ponto ótimo e de outros pontos selecionados aleatoriamente dentro da região ótima do delineamento (Figura 13). Com base nos resultados obtidos, foi possível confirmar a obtenção de resultados máximos de atividade dentro da região ótima encontrada.

Os valores de temperatura e pH ótimos obtidos são praticamente iguais aos que foram utilizados ao longo de todo o trabalho (35 °C e 4,0), portanto, optou-se por continuar a usar esses valores, por estarem dentro da região de ótimo, além da vantagem em saber que todas as determinações já estudadas foram realizadas dentro desta região.

Os resultados obtidos indicaram que a enzima de *A. niger* apresenta caráter ácido.

Nas condições estudadas, a lipase de *A. niger* apresentou ótimo de atividade na faixa de pH entre 3,0 e 5,6 e temperatura entre 30 e 55°C (Figura 13). Portanto, apresentou um perfil de acordo com o esperado para enzimas mesofílicas. Resultados semelhantes foram obtidos no trabalho de Vici et al. (2011), no qual a melhor faixa de temperatura foi entre 40° e 55°C e em pH de 3,0 a 6,0.

Alguns autores relatam que a maior parte dos estudos relacionados a atividade ótima de lipases se encontra na faixa de 30 a 65°C (GAUR, GUPTA e KHARE, 2008; BACHA et al., 2005), dados que corroboram com o presente trabalho.

Ülker e Karaoglu (2012) verificaram que o pH e temperatura ótimos de lipase purificada de *Mucor f. Corticola* foi de 7,0 e 40°C respectivamente, resultados próximos, porém com espécies diferentes, foram reportados por Shu, Yang e Yan (2007), (pH=7,0 e 40°C) para lipase de *A. niger* purificada pelas técnicas de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca aniônica e cromatografia de filtração em gel, neste caso, a enzima apresentou melhor perfil de atividade em pH dentro da neutralidade.

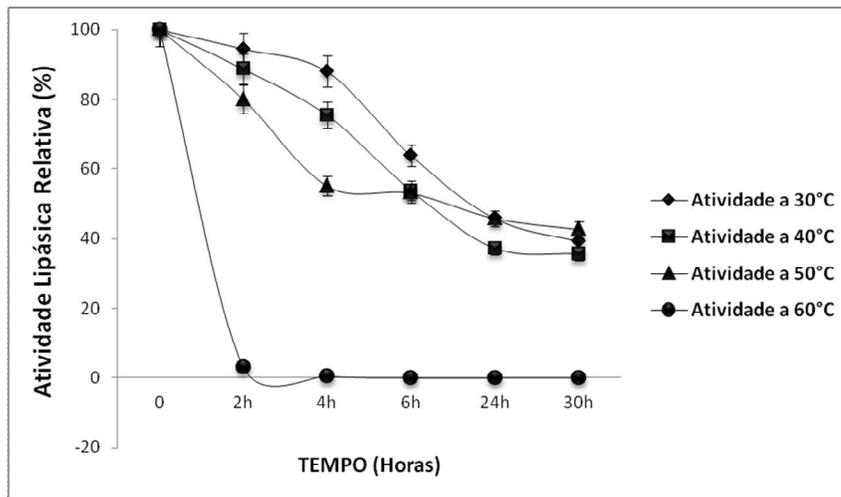
Menoncin et al. (2010) estudaram lipase de *Penicillium verrucosum* e verificaram que a enzima pré-purificada através da técnica de precipitação por sulfato de amônio (60% de saturação) apresentou condições ótimas a 42°C e pH 8,5.

Rajesh et al. (2010) reportaram que a lipase de *Trichoderma reesei* parcialmente purificada por precipitação com sulfato de amônio, apresentou atividade ótima a pH 5,0 e temperatura de 50°C.

Com estes dados, foi possível corroborar informações de outros autores de que as lipases, mesmo dentro da classe de fungos filamentosos, tem diferentes faixas de temperatura e pH ótimos de atuação.

### 5.6.2 Determinação da termoestabilidade

A termoestabilidade é uma das características requeridas para as enzimas com aplicação industrial, visto que muitos processos utilizam faixas extremas de temperatura (JAEGER e REETZ, 1998). Os resultados obtidos da termoestabilidade de *A. niger* podem ser observados na Figura 14.



**Figura 14.** Termoestabilidade da lipase de *A. niger*.

A lipase de *A. niger* apresentou perfis semelhantes nas temperaturas de 30, 40 e 50°C, embora na maior temperatura tenha ocorrido uma perda de atividade mais pronunciada nas primeiras quatro horas de incubação. A atividade residual após 30 h de incubação nas referidas temperaturas foi de cerca de 40%. Na temperatura de 60°C a enzima perdeu 97% de sua atividade, portanto, verificou-se que temperaturas acima de 50°C causam uma inativação mais rápida da lipase. Segundo Sharma et al. (2001), a estabilidade térmica de muitas lipases pode ser melhorada na presença de alguns cátions como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e por meio da utilização de técnicas de imobilização de enzimas.

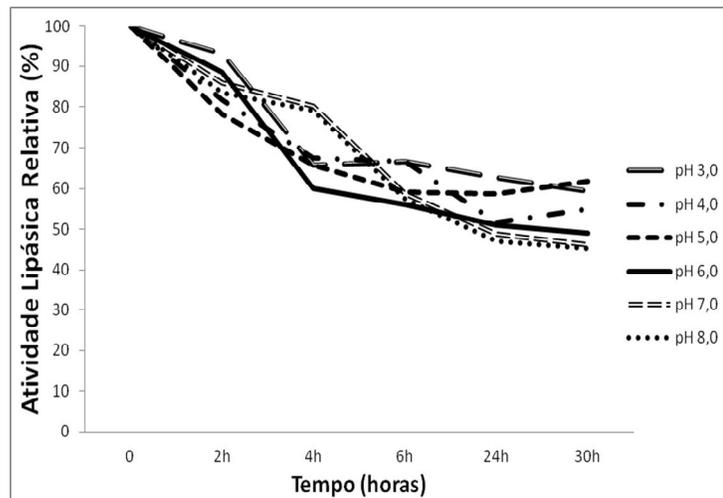
Dantas e Aquino (2010) relataram que a lipase bruta de *A. niger* obtida por FES obteve a maior atividade em temperatura de 30°C após 60 minutos de reação de hidrólise.

Ülker e Karaoglu (2012) estudaram a termoestabilidade de lipase purificada de *Mucor hiemalis f. Corticola* em temperaturas de 30 a 80°C e observaram que a enzima reteve 50% de atividade a 50°C por até 90 minutos de incubação. No entanto a 60 e 80°C a enzima perdeu completamente sua atividade, enquanto que Carvalho et al. (2005) concluíram que a lipase de *Aspergillus niger* liofilizada foi altamente termoestável, retendo 90% e 60% de atividade a 50°C e 60°C respectivamente após 1 hora de incubação.

Kamini, Mala e Puvanakrishnan (1998) estudaram a produção de lipases de *A. niger*, por fermentação no estado sólido (FES), e verificaram que a enzima bruta apresentou estabilidade máxima entre 4 e 50°C e 73,4% de atividade relativa a 60°C após uma hora de incubação. Resultados distintos foram encontrados neste trabalho. O que se observa é que a estabilidade destas enzimas varia entre os gêneros, as espécies e até entre isoformas produzidas por uma mesma cepa (LIMA et al., 2004).

### 5.6.3 Determinação da estabilidade ao pH

Os resultados obtidos durante a avaliação da estabilidade da lipase ao pH estão apresentados na Figura 15.



**Figura 15.** Estabilidade da lipase de *A. niger* ao pH a 20°C

A lipase de *A. niger* manteve 62% da atividade inicial em 30 horas de incubação em tampão citrato de sódio pH 5,0. Pôde-se observar que os perfis foram bastante semelhantes para todos os valores de pH testados, principalmente, a partir de 6 horas de incubação. Contudo, em até 30 horas a enzima apresentou estabilidade um pouco maior em valores de pH ácido: pH 3,0 (59%); pH 4,0 (55%) e pH 5,0 (62%).

Dheeman et al. (2011) relataram que a lipase pré-purificada de *Bacillus sp*, apresentou maior estabilidade em pH 5,0 e 37°C após 5 horas.

Ülker e Karaoglu (2012) estudaram a estabilidade ao pH de lipase purificada de *Mucor hiemalis f. Corticola* em valores de pH de 5,0 a 11,0 e determinaram a atividade lipásica após 24 e 72 horas de incubação a 4°C. Os autores constataram que a lipase foi extremamente estável a todos os valores de pH testados por até 24 h, além disso, a lipase reteve 75% de atividade em pH de 7,0 a 9,0 por até 72 h de incubação a 4°C.

Romero, Baigori e Pera (2007) avaliaram a estabilidade da lipase bruta de *A. niger* e verificaram que dentro da faixa de pH 7 a 10, a enzima manteve-se com 100% de atividade relativa após 1 hora a 37°C, resultados diferentes foram obtidos no presente trabalho.

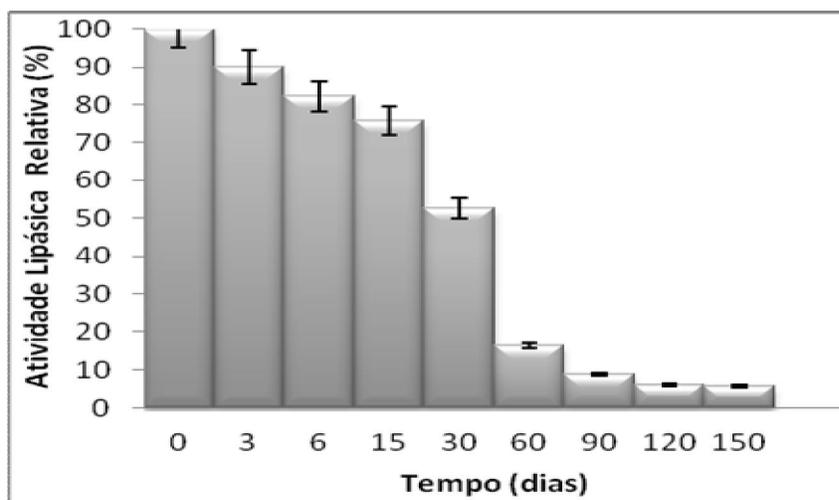
Dantas e Aquino (2010) relataram que a lipase bruta de *A. niger* obtida por FES obteve maior atividade em pH 2,0 após 60 minutos a 30°C.

Sugere-se que a lipase de *A. niger* estudada no presente trabalho, poderá ser aplicada em processos que utilizem faixas de pH relativamente ácidas, como por exemplo, maturação de queijos e em processos com temperaturas não superiores a 50°C.

#### 5.6.4 Determinação da estabilidade a estocagem sob refrigeração e congelamento

Uma etapa importante para se avaliar a capacidade da enzima manter sua atividade intacta ao longo do tempo consiste na estabilidade a estocagem. Este fator torna-se fundamental quando se deseja utilizar esta enzima em escala industrial.

Os resultados encontrados para a estabilidade da atividade lipásica sob armazenamento em geladeira (cerca de 5°C) durante 150 dias estão apresentados na Figura 16.



**Figura 16.** Estabilidade da lipase de *A. niger* a estocagem em geladeira a 5°C

Pode-se observar que em até 15 dias de estocagem a 5°C, não houve grandes perdas de atividade (24%), entretanto, com 30 dias a perda de atividade foi mais acentuada (47%) e a partir de 60 dias, a atividade lipásica foi sendo reduzida drasticamente, com perda de 94% após 150 dias de estocagem. Entretanto, após 150 dias sob temperatura de congelamento, a lipase reteve 100% de sua atividade inicial.

Portanto, a lipase de *A. niger* apresentou boa estabilidade a refrigeração por até 15 dias de estocagem a 5°C e por até 150 dias sob -18°C. Dessa forma, a lipase obtida no presente trabalho, deverá ser mantida em congelador para fins de uso comercial e/ou bancada.

Lazari (2010) verificou perda total da atividade lipásica do extrato bruto de lipase de *S. thermophilum*, após 1 dia a -20°C, resultados contrários aos obtidos no presente trabalho. Quando mantida em geladeira a atividade também decaiu rapidamente, retraindo 50% do valor inicial em 7 dias.

Brígida (2010) verificou que o extrato bruto de lipase de *Yarrowia lipolytica* reteve 100% de sua atividade inicial após sete meses de estocagem a -10°C, e após 91 dias a lipase concentrada a 60% de *Penicillium verrucosum* reteve praticamente 100% de sua atividade inicial tanto a 4°C como a -10°C (MENONCIN et al., 2010).

As propriedades de estabilidade das enzimas podem variar significativamente, em função da origem ou mesmo entre isoformas produzidas por um mesmo microrganismo (LOPEZ et al., 2004). Estas variações também dependem das condições do ensaio, como tempo de incubação, pH e temperatura e do método utilizado, tornando, muitas vezes, a comparação difícil (CARVALHO et al., 2005).

## 5.7 Perfil de ácidos graxos de diferentes óleos e especificidade enzimática

### 5.7.1 Composição dos óleos

Segundo Castro et al. (2004) a especificidade das lipases é fator crucial na determinação de suas aplicações industriais. Elas são divididas em três grupos baseados em sua especificidade: lipases não específicas, lipases 1,3 específicas e lipase ácido graxo específica. A capacidade de atuarem seletivamente sobre seus substratos depende da fonte da enzima (CASTRO et al., 2004), do tamanho da cadeia carbônica ou grau de insaturação do grupo acil em questão (GUPTA, GUPTA e RATHI, 2004).

Para a realização dos testes de especificidade, os óleos utilizados foram previamente caracterizados quanto à composição em ácidos graxos por cromatografia gasosa.

Como pode ser observado na Tabela 28, no óleo de coco predominam sequencialmente os ácidos graxos láurico (C12:0 - 50,28%); mirístico (C14:0 - 18,88%) e palmítico (C16:0 - 8,09%), outros ácidos graxos também foram encontrados, porém em percentagens menores. No óleo de girassol predominam os ácidos graxos linoléico (C18:2 - 56,21%); oléico (C18:1 - 32,13%) e palmítico (C16:0 - 6,15%). Já no óleo de oliva predominam ácidos graxos oléico (C 18:1 - 73,13%); palmítico (C16:0 – 12,20%) e linoléico (C18:2 - 8,64%). Portanto, o óleo de coco apresentou predominância dos ácidos graxos de cadeia média e nos óleos de girassol e oliva, predominam ácidos graxos de cadeia longa, sendo que estes dois últimos que apresentam altos teores de linoléico e oléico, respectivamente, são úteis para avaliar especificidade a estes ácidos graxos.

Os triacilgliceróis de cadeia média (TCM) são formados por ésteres de glicerol contendo ácidos graxos com 6 a 12 átomos de carbono e os triacilgliceróis de cadeia longa (TCL) contém ácidos graxos com mais de 12 átomos de carbono (LOPEZ; GARCIA e HILL, 2005).

**Tabela 28.** Perfil em ácidos graxos dos óleos de oliva, girassol e coco.

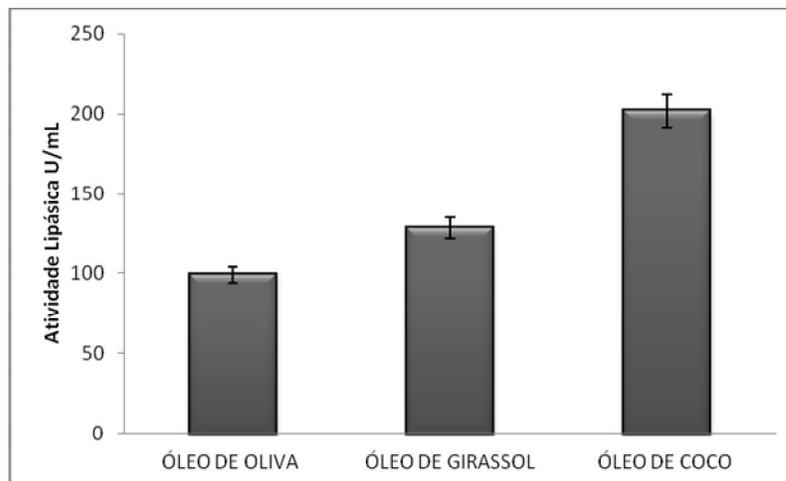
Ácidos graxos	Óleos vegetais		
	OLIVA	GIRASSOL	COCO
	Teor (%)		
C8:0	-	-	7,06
C12:0	-	-	50,28
C14:0	-	0,07	18,88
C16:0	12,2	6,15	8,09
C16:1	1,06	0,09	-
C16:1t	0,12	-	-
C18:0	3,16	3,66	3,2
C18:1	73,13	32,13	5,02
C18:2 cis/trans	-	0,09	-
C18:2	8,64	56,21	0,86
C18:3	0,64	0,19	-
C20:0	0,4	0,28	-
C20:1	0,25	0,18	-
C22:0	-	0,7	-

\*Valores médios

### 5.7.2 Avaliação da especificidade da lipase de *A. niger* sob diferentes óleos vegetais

Uma enzima pode apresentar diferentes taxas de hidrólise sobre os triacilgliceróis, principalmente quanto ao comprimento da cadeia e número de insaturações (JENSEN et al., 1983). No presente trabalho, foram obtidas as seguintes taxas de hidrólise: óleo de coco (40%), óleo de girassol (26%) e óleo de oliva (20%), resultantes de quatro repetições em triplicata, nas condições avaliadas.

Para o teste de especificidade, a lipase de *A. niger* produzida em FES foi concentrada pela técnica de liofilização com o intuito de aumentar a atividade da enzima e poder elucidar a eficiência da hidrólise enzimática frente aos óleos de diferentes características. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 17.



**Figura 17.** Avaliação da atividade hidrolítica de lipase de *A. niger* liofilizada sobre diferentes óleos. Os resultados são médias de quatro repetições em triplicata.

O extrato enzimático liofilizado catalisou a hidrólise de todos os substratos utilizados, porém, a maior atividade lipásica (201 U/mL) e taxa de hidrólise (40%), foram obtidas com a utilização de óleo de coco, como pode ser observado na Figura 17. Resultados similares foram obtidos por Couri, Dutra e Damaso (2007), que observaram que a maior atividade lipásica de *A. niger* 11T53A14 foi obtida também com óleo de coco (193,2 U/g massa seca) e por Pastore, Costa e Koblitiz (2003), que constataram que a lipase de *Rhizopus sp.* apresentou maior atividade hidrolítica sobre óleo de coco, indicando boa afinidade por ácidos graxos de cadeia média, como o láurico (C12:0). Além disso, deve se considerar a especificidade quanto à posição do ácido graxo no triacilglicerol. Óleos láuricos como óleo de coco (coconut oil) apresentam cerca de 50% de ácido láurico na composição em ácidos graxos, mas aproximadamente 80% deste ácido graxo na posição 2 do triacilglicerol, segundo Gunstone, Harwood e Padley (1994). É possível, portanto, que se trate de uma lipase 2 específica, com maior atividade por ácidos graxos saturados de cadeia média.

Diaz et al. (2006) verificaram que a lipase de *R. homothallicus*, um fungo termotolerante, apresentou máxima atividade sobre ésteres de cadeia média (C8:0).

Bradoo et al. (2002) avaliaram a atividade hidrolítica de lipase de *Bacillus stearothermophilus* SB-1 e *Burkholderia cepacia* RGP-10 em diferentes triacilgliceróis (C4:0 – C18:2), metil ésteres (C12:0 – C18:1) e segundo os autores, as lipases de ambas culturas apresentaram seletividade por alguns óleos ricos em ácidos graxos insaturados, bem como por triglicerídeos de cadeia média (C14:0) para *B. stearothermophilus* SB-1 e longa (C18:2) para *B. cepacia* RGP-10. Resultados similares foram obtidos para a lipase purificada de *Aspergillus carneus*, que apresentou preferência por triacilglicerídeos com ácidos graxos de cadeia média (C12:0) (SAXENA et al., 2003b).

A maioria dos fungos termofílicos estudados por Mateos et al. (2007) também apresentaram maior atividade sobre ésteres com cadeias de 6 a 8 carbonos, mostrando baixa atividade sobre substratos com cadeias curtas.

Ruiz et al. (2001) observaram que a lipase de *Penicillium candidum* mostrou maior atividade sobre ésteres de *p*-nitrofenila com cadeia entre 10 e 16 carbonos.

Outros fatores a considerar, no caso de extratos não imobilizados, são as condições de análise durante a hidrólise lipásica, já que a emulsificação é fundamental para o contato entre enzima e substrato, sendo mais favoráveis para óleos com ácidos graxos de menor comprimento de cadeia, em relação aos óleos com ácidos graxos de cadeia longa.

Segundo Jensen (1983) a especificidade das lipases depende de propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e fatores que afetam a ligação entre a enzima e substrato.

## 6 CONCLUSÕES

- A melhor condição para a produção de lipase de *Aspergillus niger* em colunas aeradas por FES utilizando planejamento fatorial completo, foi observada com 1,0% de borra de milho, 1vvm de aeração,  $10^6$  esporos/g de meio e 60 mL de solução de sulfato de amônio, nessas condições obteve-se atividade lipásica em torno de 216 U/gms.
- As borras de canola, milho e girassol, podem ser utilizadas como indutoras para a produção de lipase de *A. niger* em colunas aeradas por FES, entretanto, a presença das mesmas é dispensável para a produção da enzima nas condições estudadas. A maior atividade lipásica foi observada na ausência de borra, e na condição de processo de 1vvm de aeração, 60 mL de solução de sulfato de amônio (VSSA) e  $10^6$  esporos/g de meio, obtendo-se atividade em torno de 254 U/gms e produtividade de 5,3 U/gms.h.
- A lipase de *A. niger* apresenta nível de atividade e de produtividade elevados quando comparados aos valores encontrados na literatura. Altos níveis de atividade foram observados em tempos reduzidos de fermentação (48 horas) e na presença, somente, de farelo de trigo, sem adição de indutor, dessa forma, reduzindo custos com o meio de produção.
- A produção de lipase de *A. niger* ocorreu associada ao crescimento fúngico, e a maior produtividade (4 U/gms.h) foi observada com 48 horas de fermentação e atividade lipásica de aproximadamente 192 U/gms na ausência de borra. Os níveis da atividade proteásica foram menores (4 U/mL) quando comparados com os valores obtidos na presença de borra de canola (6 U/mL).
- A concentração enzimática através da precipitação com sulfato de amônio, a 90% de saturação, foi a melhor condição observada. Foi obtido 47 U/mL de atividade e 38 % de recuperação enzimática.
- A lipase de *A. niger* apresentou um perfil esperado para enzimas mesofílicas, com ótimo de atividade em pH de 3,0 a 5,6 e temperatura de 30°C a 55°C.
- A lipase apresentou um perfil de termoestabilidade semelhante para as temperaturas de 30°, 40° e 50°C, retendo cerca de 42% de sua atividade inicial por até 30 horas de incubação. Embora o perfil de estabilidade ao pH, com os valores testados, também tenha sido semelhante, após 30 horas de incubação as maiores atividades lipásicas residuais foram observadas em pH ácido: pH 3,0 (59%); pH 4,0 (55%) e pH 5,0 (62%).
- A enzima possui boa estabilidade em até 15 dias de estocagem a 5°C, retendo até 76% de sua atividade. Na temperatura de congelamento (-18°C) a lipase apresentou ótima estabilidade por até 150 dias, retendo 100% de sua atividade inicial.
- Sugere-se que a enzima possua afinidade por ácidos graxos de cadeia média, obtendo maior atividade hidrolítica (201 U/mL), quando o substrato testado foi óleo de coco.

- Sugere-se que a enzima poderá ser aplicada em processos que utilizem faixas de pH relativamente ácidas, como por exemplo, maturação de queijos que visa aprimorar o aroma do produto. Além disso, a enzima estudada no presente trabalho poderá ser utilizada em faixas de temperatura de até 50°C e poderá ser congelada por períodos de até 150 dias, sem perder sua atividade.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar estudo mais aprofundado da especificidade de lipase de *Aspergillus niger*, visando elucidar a afinidade pelo tamanho de cadeia e/ou saturação.
- Realizar os testes de especificidade com maior variedade de óleos vegetais com diferentes características.

## 8 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.
- AGUIAR, C.; MARGONAR, M. H.; LUCENA, S. L. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* e efeito do pH e da temperatura na hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos. **Anais do XVI Encontro de Química da Região Sul**, 2008, 1p.
- AQUINO, L. **Produção de Pectinase e Lipase a partir de um agente biológico**. Instituto Inovação, 2008. Disponível em: [http://www.institutoinovacao.com.br/downloads/Producao\\_enzimas](http://www.institutoinovacao.com.br/downloads/Producao_enzimas). Acesso em: 15 dez. de 2011.
- ARAVINDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. Lipase applications in food industry. **Indian Journal Biotechnology**, v. 6, p. 141-158, 2007.
- ATOMI, H. Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes. **Current Opinion in Microbiology**. v. 9, n. 2, p. 166-173, 2005.
- BABU, I. S.; RAO, G. H. Lipase production by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 in solid state fermentation using mixed substrate. **Journal of Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 469-474, 2007.
- BACHA, A. B.; GARGOURI, Y.; ALI, Y. B.; MILED, N.; REINBOLT, J.; MEJDOUB, H. Purification and biochemical characterization of ostrich pancreatic lipase. **Enzyme and microbial technology**, v. 37, n. 3, p. 309-317, 2005.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2.ed. New York: McGraw-Hill, 1986, 984p.
- BAKER, S. *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. **Medical Mycology**, v.44, p.17-21, 2006.
- BALAJI, V.; EBENEZE, P. Optimization of extracellular lipase production in *Colletotrichum gloeosporioides* by solid state fermentation. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 7, p. 1-8, 2008.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Biorreactors with immobilized lipases, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 392-416, 1996.
- BARON, A. M. **Biocatálise em ambientes aquo-restrictos: comparação de diferentes sistemas reacionais**. 2003, 113p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.
- BENJAMIM, S.; PANDEY, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipase from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 2, p. 213-221, 2001.

BEVILAQUA, J. V.; LIMA, L. M.; CUNHA, A. G.; BARREIRO, E. J.; ALVES, T. L. M.; PAIVA, L. M. C.; FREIRE, D. M. G. Hydrolysis of new phthalimide-derived esters catalyzed by immobilized lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, n. 1-3, p. 117-128, 2005.

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

BIAZUS, J. P. M.; SEVERO, J. B., JR.; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R.; TAMBOURGI, E. B., Study of amylases recovery from maize malt by ion-exchange expanded bed chromatography. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1786-1791, 2006.

BLIX, S. The determination of hexosamines according to Elson and Morgam. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 2, p. 467-78, 1948.

BON, E. P. S.; JR, N. P.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para produção de enzimas. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 506p.

BRADDOO, S.; RATHI, P.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. Microwave-assisted rapid characterization of lipase selectivities. **Journal of Biochemistry**, v. 51, p. 115-120, 2002.

BRÍGIDA, A. I. S. **Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais**. 2010. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

BURKET, J. F. M.; MALDONADO, R. R.; MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M. I. Caracterização Bioquímica da Lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552. **Anais do IV Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas, 2001, p.162.

CAMARGO, M. M.; MAIA, M. M. D.; BORBAL, F. F. S.; MELO, K. G.; SANTOS, C. M. S. O.; REIS, E. R. A.; MORAIS JR., M. A.; LIMA-FILHO, J. L. Oil/mineral-salts medium designed for easy recovery of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* AM3. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 17-20, 2003.

CANDEIA, R. A.; FREITAS, J. C. O.; CONCEIÇÃO, M. M.; SILVA, F. C.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. G. Análise comparativa do biodiesel derivado do óleo de soja obtido com diferentes alcoóis. **Anais do I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel**, Brasília, 2006, p. 169-174.

CARDENAS, F.; CASTRO, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V.; VALMASEDA, M.; ELSON, S. W.; ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. **Enzymes and Microbial Technology**, v. 28, p. 145-154, 2001.

CARLI, I. C. **Síntese de ésteres derivados de carboidratos com propriedades surfactantes utilizando lipases imobilizadas em suporte sólido**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Blumenau-SC. 2006.

CARVALHO, N. B.; SOUZA, R. L.; CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Sequential production of amylolytic and lipolytic enzymes by bacterium strain isolated from petroleum contaminated soil. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.150, p. 25-32, 2008.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A. P.; MARASSI, M.; SILDA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.; MACEDO, G. A. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B., NOFFS, M. D., OLIVEIRA, J. G., SHIMIZU, M. T., SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

CASTIGLIONI, G. L. **Estudo da produção e utilização de lipase de *Burkholderia cepacia* na síntese enzimática de biodiesel**. 2009. Tese. (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos Campinas, São Paulo, 2009.

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

CASTRO, H. F., PAULA, A. V.; BARBOZA, J. C. S. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 792-796, 2005.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleo e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n.1, p. 146-156, 2004.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 170, n. 23, p. 501-5, 1947.

CHEN, X.; DU, W.; LIU, D. Response surface optimization of biocatalytic biodiesel production with acid oil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 423-429, 2008.

CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 193-197, 2004.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: Epub, 2008, 288p.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 881-885, 2006.

COLLA, L. M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8308-8314, 2010.

CONTESINI, F. J.; SILVA, V. C. F.; MACIEL, R. F.; LIMA, R. J.; BARROS, F. F. C.; CARVALHO, P. D. Response surface analysis for the production of an enantioselective lipase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation. **Journal of Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 563–571, 2009.

CORRÊA, B. Fungos toxigênicos em grãos e rações: biologia, ocorrência e controle. **Anais do Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Micotoxicoses em Aves**. Curitiba, FACTA: Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia Avícolas, 1995, p. 15-20.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo a óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 531-73, 2000.

COURI, S.; DUTRA, J. C.; DAMASO, M. C. T. Avaliação da seletividade de lipases produzidas por meio semi-sólido em colunas aeradas. **Anais do Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM**, Curitiba, 2007, 6p.

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista de Microbiologia**, v. 26, n. 4, p. 314-317, 1995.

COURI, S.; TERZI, S. C.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, S. P.; COSTA, A. C. A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 255-261, 2000.

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

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

DAMASO, M. C. T., PASSIANOTO, M. A.; FREITAS, S. C.; FREIRE, D. M. G., LAGO, R. C. A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentations. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 39, p. 676- 681, 2008.

DANTAS, E. M.; AQUINO, L. C. L. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 81-87, 2010.

DHEEMAN, S. D.; BABUB, A. S.; FRIAS, J. M.; HENEHANA, G. T. M. Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain *Penicillium* sp. DS-39 (DSM 23773). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 256– 262, 2011.

DI LUCCIO, M.; CAPRA, F.; RIBEIRO, N. P.; VARGAS, G. D. L. P.; FREIRE, D. M. G.; DE OLIVEIRA, D. Effect of temperature, moisture and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 113, p. 173-180, 2004.

DIAZ, J. C. M.; RODRÍGUEZ, 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, p. 1042–1050, 2006.

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

DOMINGUEZ, A.; PASTRANA, L.; LONGO, M. A.; RÚA, M. L.; SANROMAN, M. A. Lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, p. 95-99, 2005.

DOWD, M. K. Gas chromatographic characterization of soapstock from vegetable oil refining. **Journal of chromatography**, v. 816, p. 185-193, 1998.

DURAND, A. Bioreactors designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2/3, p. 113-125, 2003.

DUTRA, J. C. V.; TERZI, S. C.; BEVILAQUA, J. V.; DAMASO, M. C. T.; COURI, S.; LANGONE, M. A. P.; SENNA, L. F. Lipase production in solid-state fermentation monitoring biomass growth of *A. niger* using digital image processing. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 147, p. 63–75, 2008.

EDWINOLIVER, N. G.; THIRUNAVUKARASU, K.; NAIDU, R. B.; GOWTHAMAN, M. K.; KAMBE, T. N.; KAMINI, N. R. Scale up of a novel tri-substrate fermentation for enhanced production of *Aspergillus niger* lipase for tallow hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6791-6796, 2010.

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

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques. **Methods in Enzymology**, v. 182, p. 285-300, 1990.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Introdução. In: SPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004, 510p.

FABER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry**: A textbook, 3.ed. Berlin: Springer Produktions-Gesellschaft, 1997, 423p.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, p. 8-13, 2007.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 2007, 307p.

FRÉ, N. C. **Obtenção de ácidos graxos a partir da acidulação de borra de neutralização de óleo de soja.** 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

FREIRE, D. M. G., CASTILHO, L. R. Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 81, p. 48-56, 2000.

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. 6-12, 1997.

FUCIÑOS, P.; DOMÍNGUEZ, A.; SANROMÁN, A.; LONGO, M. A.; RÚA, M. L.; PASTRANA, L. Production of thermostable lipolytic activity by *Thermus* species. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1198-1205, 2005.

GANDHI, N. N. Application of lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.74, n. 6, p. 621-634, 1997.

GANDRA, K. M.; DEK BIANCHI, M.; GODOY, V. P.; QUEIROZ, F. P. C.; STEEL, C. J. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 182-192, 2008.

GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R. Optimization of lipase production using differential evolution. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.15, n. 2, p. 254-260, 2010.

GAUR, R.; GUPTA, A.; KHARE, S. K. Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1040-1046, 2008.

GAUTAM, A. K.; SHARMA, S.; AVASTHI, S.; BHADAURIA, R. Diversity, pathogenicity and toxicology of *A. niger*: an important spoilage fungi. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 270-280, 2011.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 63, p. 1721-1754, 2007.

GODOY, M. G.; GUTARRA, M. L. E.; CASTRO, A. M.; MACHADO, O. L. T.; FREIRE, D. M. G.; Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, p. 945-53, 2011.

GOMES, C. A. O. **Produção de enzimas despolimerizantes por fermentação em meio semi-sólido por *Aspergillus niger* 3T5B8.** Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1995.

GOMES, P. M.; FREIRE, D. M. G. **Processo de Produção de Lipase por *Penicillium restrictum*** Disponível em: [http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos\\_completos/t286.doc](http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t286.doc) Acesso em: 05 nov. de 2012.

- GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 1–22, 2008.
- GRIEBELER, N.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; CECHET, J. L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; RIGO, E.; NINOW, J. L. Isolation and Screening of Lipase-Producing Fungi with Hydrolytic Activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 4, p. 578-586, 2011.
- GULTEKIN, M. S.; ÇELİK, M.; TURKUT, E.; TANYELY, C.; BALCI, M. Resolution of ( $\pm$ )-anti-2,3-dioxabicyclo(2.2.2)oct-7-en-5-ol via *Candida cylindracea* lipase: synthesis of (-)- and (+)-proto-quercitol. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, n. 3, p. 453-456, 2004.
- GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 1–21, 2011.
- GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; PADLEY, F. B. **The Lipid Handbook**. 2.ed. London: Chapman & Hall, 1994. 551 p.
- GUPTA, A.; GUPTA, V. K.; MODI, V. R.; YADAVA, L. P. Production and characterization of  $\alpha$ -Amilase from *Aspergillus niger*. **Biotechnology**, v. 3, n. 7, p. 551-556, 2008.
- GUPTA, N.; SAHAI, V.; GUPTA, R. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 518-526, 2007.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763-781, 2004.
- HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 474-476, 1973.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzymes and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.
- HENZ, J. R.; NUNES, R. V.; SILVA, W. T. M.; SCHENKNECHT, F. R.; ALMEIDA, S.; FRANK, R.; POZZA, P. C.; NUNES, C.G.V. Composição química e valores energéticos de diferentes farelos de trigo para aves. **Anais do Zootec**, Águas de Lindóia/SP, 2009, 4p.
- HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 277-286, 2008.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. v. 1, 3.ed. São Paulo: IAL, 1985, 533 p.
- ISEO. **Food fats and oils**. Nova York, Institute of Shortening and Edible Oils. 2006.
- IWASHITA, K., Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 530-535, 2002.

- IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization: Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1019-1032, 2008.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390-397, 2002.
- JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; KOCH, B. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B. W. Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 332, n. 1/2, p. 143-149, 1993.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 396-403, 1998.
- JAYAPRAKASH, A.; EBENEZER, P. Investigation on extracellular lipase production by *Aspergillus japonicus* isolated from the paper nest of *Ropalidia marginata*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 2, p. 113-117, 2010.
- JENSEN, R. G. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. **Lipids**, v. 18, p. 650-657, 1983.
- JENSEN, R. G.; DEJONG, F. A.; CLARK, R. M. Determination of lipase specificity. **Lipids**, v. 18, n. 3, p. 239-252, 1983.
- JORDAN, S. N., MULLEN, G. J. Enzymatic hydrolysis of organic waste materials in a solid-liquid system. **Waste Management**, v. 27, p. 1820-1828, 2007.
- JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; THOMAS, G.; SHRIVASTAVA, N. Standard Review Cold-active microbial Lipases: a versatile tool for industrial applications. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 2, n. 2, p. 039-048, 2007.
- KADEMI, A.; AÏT-ABDELKADER, N.; FAKHREDDINE, L.; BARATTI, J. C. Characterization of a new thermostable esterase from the moderate thermophilic bacterium *Bacillus circulans*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 395-401, 2000.
- KAMINI, N. R.; MALA, J. G. S.; PUVANAKRISHNAN. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 505-511, 1998.
- KARAM, J., NICELL, J. A. Potential application of enzymes in waste treatment. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, v. 69, p. 141-153, 1997.
- KIELING, D. D. **ENZIMAS: Aspectos Gerais**. Relatório Técnico - Universidade Federal de Santa Catarina. 2002. Disponível em: [http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng\\_bioq/lista\\_exerc/enzimas\\_aspectos\\_gerais](http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/lista_exerc/enzimas_aspectos_gerais). Acesso em: 20 jan. de 2011.
- KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual de Biodiesel**. Edgard Blücher, Brasil, 2006, 340 p.
- KORNBERG, A. Why purify enzymes? **Methods Enzimol Journal**, v. 182, p. 1-5, 1990.

- KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems - an overview. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 25, n. 1-2, p. 1-30, 2005.
- KRISHNA, S. H. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 239–267, 2002.
- LAZARI, S. A. **Caracterização bioquímica da atividade lipásica de *Scytalidium thermophilum* RP-250: uma linhagem hipersecretora de lipases**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2.ed. Curitiba: Ed. do Autor, 1997, p.148.
- LEITÃO, M. F. F.; HAGLER, L. C. S. M.; HAGLER, A. N.; MENEZES, T. J. B. **Tratado de microbiologia: microbiologia de alimentos, sanitária e industrial**. São Paulo: Manole, 1988. v. 1, p. 181.
- LIMA, M. R.; SILVA, V. P. A.; FURTADO, R. F.; ALVES, C. R.; GUEDES, M. I.F.; DUTRA, R. A. F.; Purificação de ricina a partir de saturação com sulfato de amônio (2008). **Anais do Congresso brasileiro de mamona, energia e ricinoquímica**, Salvador-BA, 2008.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. v. 3. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001, 593 p.
- LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; FONTANA, J. D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, p. 65-71, 2004.
- LINKO, Y. Y.; LAMSA, M.; WU, X.; UOSUKAINEN E.; SEPPALLA, J.; LINKO, P. Biodegradable products by lipase biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 41-50, 1998.
- LIU, Z.; CHI, Z.; WANG, L.; LI, J. 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, p. 445-451, 2008.
- LOPEZ, H. A.; GARCIA, H. S.; HILL JR. C, G. Lipase-catalyzed Transesterification of Medium-chain Triacylglycerols and a Fully Hydrogenated Soybean Oil. **Journal Food Science**. v. 70, n. 6, p. 365c-372c, 2005.
- LOPEZ, N.; PERNAS, M. A.; PASTRANA, L. M.; SANCHEZ, A.; VALERO, F.; RUA, M. Reactivity of pure *Candida rugosa* lipase isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in aqueous and organic media. influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 1, p. 65-73, 2004.
- LOWRY, O. H.; ROSEMBROUH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265, 1951.

MAARTENS, A.; SWART, P.; JACOBS, E. P. Na enzymatic approach to the cleaning of ultrafiltration membranes fouled in abattoir effluent. **Journal of Membrane Science**, v. 119, p. 9-16, 1996.

MAG, T. K.; GREEN, D. H.; KWONG, A. T. Continuous Acidulation of soapstock and recovery of acid oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 60, n. 5, p. 1008-1011, 1983.

MAGALHÃES, J. **Enzimas e Cinética Enzimática**, 2004. Disponível em: <http://www.xyzt.atomic-hosting.com/vi/enzimas.htm>. Acesso em: 20 dez. de 2011.

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

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S. K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1729-1735, 2008.

MAKIMURA, K. *Aspergillus niger*. 2002. Disponível em: < <http://www.pfdb.net/html/species/s12.htm> >. Acesso em: 02 out. 2012.

MALA, J. G. S.; EDWINOLIVER, N. G.; KAMINI, N. R.; PUVANAKRISHNAN, R. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 247-253, 2007.

MALISZEWSKA, I.; MASTALERZ, P. Production and some properties of lipase from *Penicillium citrinum*. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 14, p. 190-193, 1992.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1942-1947, 2008.

MATEOS, J. C.; RUIZ, K.; RODRIGUEZ, J. A.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Mapping substrate selectivity of lipases from thermophilic fungi. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49, p. 104-112, 2007.

MATSUOKA, H.; MIURA, A.; HORI, K. Symbiotic effects of a lipase-secreting bacterium, *Burkholderia arboris* SL1B1, and a glycerol-assimilating yeast, *Candida cylindracea* SL1B2, on triacylglycerol degradation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 4, p. 401-408, 2009.

MAX, B.; SALGADO, J. M.; RODRÍGUEZ, N.; CORTÉS, S.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of citric acid, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 862-875, 2010.

MENDES, A. A; CASTRO, H. F; PEREIRA, E. B.; FURIGO JR, A. Aplicação de enzimas hidrolíticas no pré-tratamento de águas residuárias com elevado teor de lipídeos, **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.

MENEZES, G. D. G.; OLIVEIRA, A. C. P.; DAMASO, M. C. T.; OLIVEIRA, M. A. C.; COURI, S. Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3t5b8 em fermentação semi-sólida utilizando como substrato resíduo de maracujá e farelo de trigo. **Revista Universidade Rural, Série. Ciências Exatas e da Terra**, v. 25, n. 1, p. 15-27, 2006.

MENONCIN, S.; DOMÍNGUES, N. M.; FREIRE, D. M. G.; TONIAZZO, G.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Study of the extraction, concentration, and partial characterization of lipases obtained from *Penicillium verrucosum* using solid-state fermentation of soybean bran, **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 537-544, 2010.

MHETRAS, N. C.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1486-1490, 2009.

MINIM, V. P. R.; CECCHI, H. M.; MINIM, L. A. Determinação de substitutos da manteiga de cacau em coberturas de chocolate através da análise de triacilgliceróis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 277-281, 1999.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of Solid State Bioprocessing. **Biotechnology Annual Review**, v. 8, p. 183-225, 2002.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. **The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena**. In: MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Heidelberg : Springer, p.13-32, 2006.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 68, p. 61-138, 2000.

MOREIRA, C. G. ; DAMASO, M. C. T. ; VALADÃO, R. C. ; COURI, S. Screening of lipolytic filamentous fungi and study of lipase production using three different reactors. **In.:Anais: 5th International Technical Symposium on Food Processing, Monitoring Technology in Bioprocesses and Food Quality Management**, Potsdam, p. 892-895, 2009.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas - Poderosa ferramenta na indústria. **Revista Ciência Hoje**. v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

NASCIMENTO, M. G.; DALLA-VECCHIA, R.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

NASCIMENTO, M. G.; ZANOTTO, S. P.; MELEGARI, S. P.; MORAN, P. J. S. Estudos de proteção da célula de *saccharomyces cerevisiae* para utilização em reações de redução em meio orgânico. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 567-571, 2002.

NAVARRO, A. S.; GEA, T.; BARRENA, R.; SÁNCHEZ, A. Production of lipases by solid state fermentation using vegetable oil-refining wastes. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10080-10084, 2011.

NETO, J. A. Purificação de enzimas. In: URGEL, A. L.; AQUARONE, E.; BORZANI, V.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**, v. 3, São Paulo: Ed. Blucher, 2007.

- NGUYEN, D.; ZHANG, X.; JIANG, Z. H.; AUDET, A.; PAICE, M. G.; RENAUD, S.; TSANG, A. Bleaching of kraft pulp by a commercial lipase: Accessory enzymes degrade hexenuronic acids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 130-136, 2008. Special Issue: Biotechnology of Renewable Resources, Biomass and Biofuels.
- NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 769-777, 2005.
- NOVOZYMES, 2008. **Enzimas**. Disponível em: [http://www.novozymes.com.br/produtosesolucoes\\_enzimas.htm](http://www.novozymes.com.br/produtosesolucoes_enzimas.htm). Acesso em: 05 dez. de 2011.
- OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; FACCIO, C.; ROSA, C. D.; BENDER, J. P.; LIPKE, N. Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113-116, p. 771-780, 2004.
- PALEKAR, A. A.; VASUDEVAN, P. T.; YAN, S. Purification of Lipase: a Review. **Biocatalysis Biotransformation**. v. 18, p. 177-200, 2000.
- PALMA, M.; PINTO, A. L.; GOMBERT, A. K.; SEITZ, K. H.; KIVATINITZ, S. C.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 1137-1145, 2000.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-69, 2000.
- PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 29, p. 119-131, 1999.
- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolic production in submerged mycelia processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189-259, 2004.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.
- PARANTHAMAN, R.; ALAGUSUNDARAM, K.; INDHUMATHI, J. Production of Protease from Rice Mill Wastes by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 3, p. 308-312, 2009.
- PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lípase extracelular produzida por uma nova linhagem de *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 135-140, 2003.
- PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*: a comparative study between free and enzyme immobilized onto porous chitosan beads. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 91-93, p. 739-752, 2001.

PEREIRA, E. B.; DE CASTRO, H. F.; FURIGO JR, A. Hidrólise enzimática do efluente proveniente de frigorífico avícola empregando lipase de *Candida rugosa*. In: **Anais. XIV Simpósio Nacional de Fermentações - SINAFERM**, Florianópolis, SC, 2003.

PESSOA JR.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri-SP: Manole, 2005, 444p.

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

PITOMBO, R. N. M. Liofilização. In: PESSOA JR, A.P.; KILIKIAN, B.V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri, SP: Manole, p. 332-348, 2005.

POKORNY, D.; CIMERMAN, A.; STEINER, W. *Aspergillus niger* lipases: induction, isolation and characterization of two lipases from a MZKI A116 strain. **Journal of Molecular Catalysis: B - Enzymatic**, Amsterdam, v. 2, p. 215-222, 1997.

RAJESH, E. M.; ARTHE, R.; RAJENDRAN, R.; BALAKUMAR, C.; PRADEEPA, N.; ANITHA, S. Investigation of lipase production by *trichoderma reesei* and optimization of production parameters. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, n. 7, p. 1177-1189, 2010.

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3975–3981, 2008.

RAPER, K. B.; FENNEL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: Willians & Wilkins. 1965, 686 p.

RATHI, P.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. **Process Biochemistry, Essex**, v. 37, p. 187-192, 2001.

RIGO, E.; NINOW, J. L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1132-1137, 2010.

ROBINSON, T.; NIGAM, P. Bioreactor desing for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 197-203, 2003.

RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica**. 2006. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 1.ed. Campinas: Casa do pão, 2005, 325p.

ROH, C.; VILLATTE, F. Isolation of a low-temperature adapted lipolytic enzyme from uncultivated micro-organism. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 116-123, 2008.

- ROMERO, C. M.; BAIGORI, M. D.; PERA, L. M. Catalytic properties of mycelium-bound lipases from *Aspergillus niger* MYA 135. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 76, p. 861-866, 2007.
- ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 126-131, 2010.
- RUIZ, B.; FARRES, A.; LANGLEY, E.; MASSO, F.; SANCHEZ, S. Purification and characterization of an extracelular lipase from *Penicillium candidum*. **Lipids**, v. 36, p. 283 – 289, 2001.
- SAKURAI, Y.; LEE, T. H.; SHIOTA, H. On the convenient for glucosamine estimation in Koji. **Agriculture Biology Chemistry**, v. 41, n. 4, p. 619-24, 1977.
- SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. Lipase production: Na insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36-44, 2012.
- SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 79, p. 66-73, 2011.
- SAMSON, R. A.; NOONIM, P.; MELJER, M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; VARGA, J. Diagnostic tools to identify black aspergilla. **Studies in Mycology**, n. 59, p. 129–145, 2007.
- SANTOS, E. S. **Recuperação e purificação de enzimas usando adsorção em leite expandido**. 2001. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, 2001.
- SANTOS, Regiane Ribeiro. **Caracterização e aplicação de borras do refino de óleos vegetais para produção de lipase fúngica por fermentação no estado sólido**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.
- SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção de poligalacturonase. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1973-1978, 2008.
- SAXENA, R. K.; GHOSH, P. K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W. S.; BRADDOO, S.; GULATI, R. Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. **Current Science**, v. 77, p. 101-115, 1999.
- SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 1-18, 2003a.
- SAXENA, R. K.; DAVIDSON, W. S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 239-247, 2003b.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia industrial**: Engenharia bioquímica. v. 2. São Paulo: Eddgard Blüsher, 2001, 541p.

SCHUBER, L. C. L.; CRUZ, M. C. R.; BONFIM, T. M. B.; BRAND, D.; PASTORE, G. M.; ALMEIDA, M. M. Isolamento e seleção de fungos produtores de  $\beta$ -galactosidase. **Evidência**, v. 12, n. 1, p. 19-40, 2012.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; VAN DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 4, p. 426-435, abr. 2002.

SCRIBAN, E. **Biotechnologia**. São Paulo: Manole, 1985, 498p.

SHARMA, A.; BARDHAN, D.; PATEL, R. Optimization of physical parameters for lipase production from *Arthrobacter* sp. BGCC490. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 46, p. 178-183, 2009.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances, Oxford**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

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

SHU, Z. Y.; YANG, J. K.; YAN, Y. J. Purification and Characterization of a Lipase from *Aspergillus niger* F044. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 96-101, 2007.

SILVA, M. F.; FREIRE, D. M. G.; CASTRO, A. M.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, J. V. Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 2, p. 145-152, 2011.

SILVA, W. O. B.; MITIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 321- 326, 2005.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; ZANETTIN, L.; PIN, H. K.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P.; TREVISOL, L. R.; CARVALHO, R. D.; SCHAUREN, D.; ROCHA, C. L. M. S. C.; BARONI, S. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 700-705, 2010.

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

SOUZA, R. L. A.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. L. H.; AMORIM, B. C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 9, p. 987-992, 2010.

- SUAN, C.; SARDIMI, M. R. Immobilised lipase-catalysed resolution of (R,S)- 1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 28, p. 111-119, 2004.
- SUN, S. Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: biochemical characterization and esterification potential for ester synthesis. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 9, p. 2607–2612, 2009.
- TAN, T.; ZHANG, M. X.; ZHANG, J. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium. Camembertii* Thom PG-3. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1495-1502, 2004.
- 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.
- THAKAR, A.; MADAMWAR, D. Enhanced ethyl butyrate production by surfactant coated lipase immobilized on silica. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3263-3266, 2005.
- TOLEDO, A. L.; SEVERO JR., J. B.; SOUZA, R. R.; CAMPOS, E. S.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Purification by expanded bed adsorption and characterization of  $\alpha$ -amylases FORILASE NTL® from *A. niger*. **Journal of Chromatography B**, v. 846, n. 1, p. 51-56, 2007.
- TORRES, R.; ORTIZ, C.; PESSELA, B. C. C.; PALOMO, J. M.; MATEO, C.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via adsorption on polyethylenimine-agarose under different experimental conditions. **Enzyme Microbial Technology**, v. 39, p. 167-171, 2006.
- TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. **Microbiologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1991, 386p.
- TSURUDA, A.; SANTINELLO, C. B.; LIMA, V. M. G.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B. Produção e Caracterização da lipase de *Trichoderma sp.* In: VII Semin. Brasil. Tecnol. Enzim. **Anais do ENZITEC**, Caxias do Sul, Brasil, v.1, 2006, p. 116-116.
- ÜLKER, S.; KARAOGLU, S. A. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. corticola* isolated from soil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 385-390, 2012.
- UNDURRAGA, D.; MARKOVITS, A.; ERAZO, S. Coco butter equivalent through enzymatic interesterification of palm oil midfraction. **Process Biochemistry**, n. 36, p. 933-939, 2001.
- VARDANEGA, R.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; POLLONI, A.; RIGO, E.; NINOW, J. L. A systematic study on extraction of lipase obtained by solid-state fermentation of soybean meal by a newly isolated strain of *Penicillium sp.* **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 461–465, 2010.
- VECCHIA, R. D.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, W. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

VICI, A. C.; TRISTÃO, A. P.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. **Caracterização bioquímica das lipases intra e extracelulares produzidas pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger***. Departamento de Biologia. Universidade de São Paulo – USP. Disponível em: <http://www.usp.br/siicusp/Resumos/16Siicusp/1280>. Acesso em: 03 fev. 2011.

VIEIRA, G. A. B.; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; MELO, V. M. M.; GONZALO, G.; GOTOR-FERNANDEZ, V.; GOTOS, V. **Chemoenzymatic synthesis of optically active Mugetanol isomers: use of lipases and oxidoreductases in fragrance chemistry**, *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 20, n. 2, p. 214-219, 2009.

WAINWRIGHT, M. **Introducción a la biotecnología de los hongos**. Zaragoza: Acribia, 1995. 228 p.

WANG, D.; XU, Y.; SHAN, T. Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, p. 30–37, 2008.

WANG, L.; YANG, S. T. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources: New Technologies and Applications**, Chapter 18: Solid State Fermentation and Its Applications. Editora: Elsevier. p. 465-489. 2007.

WANG, Y.; SRIVASTAVA, K. C.; SHEN, G. J.; WANG, H. Y. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC 53841). **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, n. 5, p. 433- 438, 1995.

WATANABE, Y.; YAMAUCHI-SATO, Y.; NAGAO, T.; YAMAMOTO, T.; OGITA, K.; SHIMADA, Y. Production of monoacylglycerol of conjugated linoleic acid by esterification followed by dehydration at low temperature using *Penicillium camembertii* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, p. 249-254, 2004.

YADAV, G. D.; LATHI, P. S. Synthesis of citronellol laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: kinetic studies. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, p. 113-119, 2004.

ZAITS, C. – Fungos oportunistas. In: ZAITS, C., CAMPBELL, I., MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R. B., SOUZA, V. M. **Compêndio de Micologia Médica**, 1.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1998, 540p.

ZAREVÚCKA, M.; KEJIK, Z.; SAMAN, D.; WIMMER, Z.; DEMNEVORÁ. Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 481-486, 2005.

## **ANEXOS**

**ANEXO A** - Cálculo da Contagem de Esporos/g de meio

**ANEXO B** - Preparo de Solução Tampão Fosfato de Sódio 0,1M

**ANEXO C** – Curva Padrão de Glicosamina

**ANEXO D** - Preparo de Solução Tampão Citrato de Sódio 0,05M

**ANEXO E** - Cálculos para Transformação de Atividade em U/mL para Atividade em U/g massa seca (U/gms)

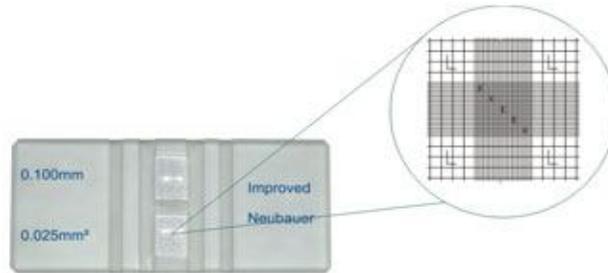
**ANEXO F** - Curva Padrão de Proteína

**ANEXO G** - Reagentes e seus Respective Fornecedores

**ANEXO H** - Equipamentos e seus Respective Fabricantes

## ANEXO A - Cálculo da Contagem de Esporos/g de meio

Considerando-se que a câmara de Neubauer contém 25 quadrículos. Entre a câmara e a lamínula, forma-se um filme líquido da diluição preparada de 0,1 mm de espessura. A dimensão de cada quadrículo é de 0,2 mm x 0,2 mm, portanto o volume de cada quadrículo é de  $4 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ , que multiplicado pelo número total de quadrículos (25) é igual a  $10^{-4} \text{ cm}^3$ .



**Figura 18.** Câmara de Neubauer

$$C = \frac{\text{n}^\circ \text{ de esporos} * D * 25 * 10^4}{5}$$

Onde:

C= concentração de esporos/ mL

D= diluição.

n° de esporos = quantidade de esporos contados.

$$V = \frac{m * \text{Esporos}}{C}$$

Onde:

C= Concentração de esporos.

Esporos = esporos/g de meio a ser inoculado.

V= volume de extrato enzimático a ser inoculado.

## ANEXO B - Preparo de Solução Tampão Fosfato de Sódio 0,1M

**Solução (A):** Solução fosfato de sódio monobásico 0,2M

**Solução (B):** Solução fosfato de sódio dibásico 0,2M

Solução A (mL)	Solução B (mL)	pH
93,5	6,5	5,7
92,0	8,0	5,8
90,0	10,0	5,9
87,7	12,3	6,0
85,0	15,0	6,1
81,5	18,5	6,2
77,5	22,5	6,3
73,5	26,5	6,4
68,5	31,5	6,5
62,5	37,5	6,6
56,5	43,5	6,7
51,0	49,0	6,8
45,0	55,0	6,9
39,0	61,0	7,0
33,0	67,0	7,1
28,0	72,0	7,2
23,0	77,0	7,3
19,0	81,0	7,4
16,0	84,0	7,5
13,0	87,0	7,6
10,5	90,5	7,7
8,5	91,5	7,8
7,0	93,0	7,9
5,3	94,7	8,0

### ANEXO C – Curva Padrão de Glicosamina

Preparo de soluções para curva padrão de glicosamina (BLIX, 1948; SAKURAI, LEE e SHIOTA, 1977).

Solução-mãe (mL)	Água destilada (mL)	Concentração final (mg/mL)
1	9	10
2	8	20
3	7	30
4	6	40
5	5	50
6	4	60
7	3	70
8	2	80
9	1	90

#### ANEXO D - Preparo de Solução Tampão Citrato de Sódio 0,05M

**Solução (A):** Solução ácido cítrico 0,1M

**Solução (B):** Solução citrato de sódio 0,1M

Solução A (mL).	Solução B (mL).	pH
46,5	3,5	3,0
43,7	6,3	3,2
40,0	10,0	3,4
37,0	13,0	3,6
35,0	15,0	3,8
33,0	17,0	4,0
31,5	18,5	4,2
28,0	22,0	4,4
25,5	24,5	4,6
23,0	27,0	4,8
20,5	29,5	5,0
18,0	32,0	5,2
16,0	34,0	5,4
13,7	36,3	5,6
11,8	38,2	5,8
9,5	40,5	6,0
7,2	42,8	6,2

**ANEXO E - Cálculos para Transformação de Atividade em U/mL para Atividade em U/g massa seca (U/gms)**

a) 40 g meio-----100%

x-----% umidade (meio inoculado)

x = g meio úmido

b)  $40 - x = W$  g meio seco

c) U/mL (atividade)-----1 mL

y-----100 mL

y= U em 100 mL de tampão (que são usados para 40 g de meio)

d) Y-----W g

Z-----1g

Z= U/g massa seca

## ANEXO F - Curva Padrão de Proteína

Preparo de soluções para curva padrão de proteína utilizando soro albumina bovina (SBA) (LOWRY et al., 1951).

<b>SOLUÇÃO MÃE (ML)</b>	<b>ÁGUA DESTILADA (ML)</b>	<b>CONCENTRAÇÃO FINAL (mg/L)</b>
10	90	10
20	80	20
30	70	30
40	60	40
50	50	50
60	40	60
70	30	70
80	20	80
90	10	90

## ANEXO G - Reagentes e seus Respectivos Fornecedores

Reagentes	Fornecedores
Acetona	Isofar
Ácido acético	Merck
Ácido cítrico	Grupo Química
Ácido clorídrico	Isofar
Ácido sulfúrico	Vetec
Ácido tricloracético	Carlo Erba
Ágar-ágar	Isofar
Azocaseína	Sigma
Biftalato de potássio (KOH)	Isofar
Carbonato de sódio	Isofar
Citrato de sódio	Merck
Cloreto de potássio (KCl)	Vetec
Etanol	Vetec
Fosfato de potássio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Vetec
Fosfato de sódio dibásico (NaHPO <sub>4</sub> )	Merck
Fosfato de sódio monobásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
Fosfato dibásico de potássio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Grupo Química
Goma arábica	Vetec
Hidróxido de potássio (KOH)	Reagen
Hidróxido de sódio (NaOH)	Merck
Nitrato de sódio (NaNO <sub>3</sub> )	Reagen
Peptona de soja	Himedia
Soro Albumina (BSA)	Sigma
Sulfato de amônio (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Vetec
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> )	Reagen
Sulfato de manganês (MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	Reagen
Sulfato de zinco (ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	Reagen
Sulfato ferroso (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	Baker Chemical
Twen 80	Reagen

## ANEXO H - Equipamentos e seus Respectivos Fabricantes

Equipamentos	Fabricantes	Modelo
Autoclave	Primatec	-
Balança analítica	Mettler	AT201_
Banho Maria com agitação	Precision ScientificCarl	-
Banho Maria com circulação	Marconi	-
Bomba de vácuo	Solab	-
Cabine de controle biológico	Nuaire	425-200
Câmara de Neubauer	Boeco Germany	-
Capela	Scientech	-
Centrífuga	Sorvall	-
Espectrofotômetro	Biospectro	SP 220
Estufa B.O.D.	Fanem	347CDG
Estufa para secagem	Ética	-
Fluxo laminar	Nuaire	425-200
Liofilizador	Supermodulyo	220
Microscópio	Zeiss Jena	-
Mix	Philips Walita	-
Placas de agitação	Nova Tecnica	-
Potenciômetro	Analyser	pH300M
Titulador automático	Metrohm	794 basic titrino