

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

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

Autor: Ingrid Cavalcanti Feitosa

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

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

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

ARACAJU, SE - BRASIL

MARÇO DE 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

Ingrid Cavalcanti Feitosa

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

Aprovada por:

Álvaro Silva Lima

Cleide Mara Faria Soares

Manoel Marcelo do Prado

Gisella Maria Zanin

Luanda Gimeno Marques

ARACAJU, SE - BRASIL

MARÇO DE 2009

F311p Feitosa, Ingrid Cavalcanti.

Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa. / Ingrid Cavalcanti Feitosa; orientação [de] Álvaro Silva Lima, Cleide Mara Farias Soares, Manoel Marcelo do Prado. – Aracaju: [s.n.], 2009.

104 p.: il.

Inclui bibliografias

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) –
Universidade Tiradentes.

1. Tecnologia do petróleo. I. Lima, Álvaro Silva (orient.). II. Soares, Cleide Mara Farias (orient.). III. Prado, Manoel Marcelo do (orient.). IV. Título.

CDU: 665.6

*Aos meus pais Jonaldo e Iêda pela vida concedida
e por todos esses anos de muito aprendizado, compreensão e amor.*

AGRADECIMENTOS

Pela fé, perseverança, força, coragem, otimismo e principalmente amor, agradeço a Deus.

À minha família, meus pais Iêda e Jonaldo, ao meu irmão Irving e à minha avó Elizabeth, por serem meu “porto seguro” nas tempestades e os raios de Sol que sempre iluminaram a minha vida com amor, paz, alegrias e esperança.

Ao Vitor, meu namorado, pelo amor, carinho, respeito, amizade e, sobretudo compreensão dedicados a estes meses curtos e longos ao mesmo tempo. TE AMO!!!

À prof^a Cleide que me surpreendeu ao longo desses meses, com seu jeitinho paulista-mineiro-nordestino, isto é, quando era preciso ela cobrava, “puxava a orelha” e exigia resultados, sem perder o jeito doce, meigo, compreensivo e principalmente a paciência. Obrigada pelo conhecimento transmitido, pela dedicação, amizade e por ter me ajudado a realizar mais um sonho em minha vida.

Ao prof^o Álvaro pela atenção, pela paciência de responder às minhas dúvidas e por compartilhar conhecimentos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao prof^o Manoel pela atenção dispensada e suporte para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de mestrado pelo companheirismo, amizade, conversas e compreensão, principalmente a Elayne, Rafaela, Rita, Erick, Emiliano e Wilson.

Ao Roneval, por sua paciência e principalmente sua amizade e alegria que fizeram dos meus dias no laboratório muito melhores e mais divertidos.

Aos meus estagiários Igor, Wanessa, Murillo, Priscilla e Meiry pela amizade, companheirismo e suporte.

Às amigas Carina e Inaura que por estarem passando pela mesma etapa compreendiam perfeitamente todas as angústias, lágrimas e glórias alcançadas.

À Elisângela pelas conversas e ajuda concedida.

À toda equipe do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB); Laboratório de Pesquisa em Alimentos (LPA) e do Laboratório de Minimização e Tratamento de Efluentes (LMTE).

A todos os funcionários e professores do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) e da Universidade Tiradentes que contribuíram, direta ou indiretamente, na realização desta dissertação.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro recebido para o desenvolvimento deste trabalho.

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

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

Ingrid Cavalcanti Feitosa

Um dos inconvenientes do ponto de vista econômico no uso de enzimas é a sua disponibilidade comercial, apesar de serem altamente específicas e apresentarem alta eficiência catalítica, normalmente não são empregadas em larga escala por serem altamente sensíveis às variações do meio reacional. Faz-se necessário a busca de novas alternativas de substratos e microrganismos para produzir enzimas lipolíticas com menor custo. O objetivo do presente trabalho foi estudar a produção de enzimas lipolíticas por bactérias em fermentação submersa. Avaliou-se o efeito da concentração do indutor (óleo de coco), pH e temperatura, tipo e concentração de surfactante (Tween 80, Triton X-100 e PEG 1500), pré-purificação e secagem. Na obtenção da enzima lipolítica a concentração de 4% (v/v) do óleo de coco promoveu a maior atividade enzimática (3455 U/mL), já a influência do pH e temperatura foi observada utilizando planejamento fatorial 2^2 com 3 pontos centrais, sendo a faixa entre pH 5,0 e 7,0 e temperaturas entre 30° e 37°C a que promoveu a maior atividade lipolítica (4617 U/mL). Dentre os surfactantes utilizados, Tween 80 e Triton X-100 foram mais efetivos na produção da enzima (6882 U/mL e 7185 U/mL, respectivamente). Após esta seleção, adotou-se um planejamento fatorial 2^2 , por meio do qual foi determinada que a melhor concentração de surfactante foi de 1,0% (Triton X-100 de 7185 U/mL e Tween 80 de 6882 U/mL). Para a pré-purificação enzimática foram testadas diferentes concentrações de saturação de sulfato de amônia, sendo que o maior fator de purificação (4 vezes) ocorreu para a concentração de 80%, na fermentação contendo Triton X-100. A secagem da enzima foi realizada utilizando radiação infravermelho com comprimento de onda curto, onde observou-se o aumento da atividade específica em temperaturas de secagem de 42° e 48°C (57633 U/g e 59276 U/g, respectivamente).

Palavras Chaves – enzima lipolítica, surfactantes, óleo de coco, fermentação submersa.

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

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

Ingrid Cavalcanti Feitosa

One of the inconvenience of the economic point of view in enzymes use is their commercial availability, although highly specific and shows high catalytic efficiency, are not usually employed in large scale because they are highly sensitive to variations in the reaction medium. It is necessary a research for new alternatives of substrates and microorganisms to produce lipolytic enzymes with less cost. The objective of this study was the production of lipolytic enzymes by bacteria in submerged fermentation. It was evaluated the effect of the inducer concentration (palm oil), pH and temperature, type and concentration of surfactant (Tween 80, Triton X-100 and PEG 1500), pre-purification and drying. In obtaining the lipolytic enzyme the concentration of 4% (v / v) of palm oil promoted higher enzyme activity (3455 U / mL), the influence of pH and temperature was observed using 2² factorial design with 3 central points, being the pH range between 5.0 and 7.0 and temperatures between 30 and 37 C that promoted the highest lipolytic activity (4617 U / mL). Among the surfactants used, Tween 80 and Triton X-100 were more effective in enzyme production (6882 U / mL and 7185 U / mL, respectively). After this selection, a factorial design 2² was adopted for determination to the best surfactant concentration, that was 1.0% (Triton X-100, 7185 U / mL Tween 80, and 6882 U / mL). For the enzyme pre-purification were tested different saturation concentrations of ammonium sulfate, and the biggest factor purification (4 times) occurred in the concentration of 80%, containing Triton X-100. The drying of the enzyme was performed using infrared radiation (IV) with a wavelength of short, where was observed an increase in the specific activity of drying temperatures of 42 ° and 48 ° C (57633 U / g and 59,276 U / g, respectively).

Key-Words: lipolytic enzymes; surfactants; coconut oil; submerged fermentation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	1
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1. ENZIMAS	4
3.1.1. Enzimas Lipolíticas	5
3.1.2. Vantagens das Enzimas Lipolíticas	7
3.1.3. Enzimas Lipolíticas de Origem Microbiana	8
3.1.4. Classificação de Enzimas Lipolíticas	10
3.1.5. Aplicações das Enzimas Lipolíticas	11
3.2. PROCESSOS FERMENTATIVOS	17
3.2.1. Fermentação Submersa	17
3.2.2. Fermentação em Estado Semi-Sólido	19
3.3. INFLUÊNCIA DO MEIO NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS	20
3.3.1. pH	20
3.3.2. Temperatura	20
3.3.3. Fonte de carbono	21
3.3.4. Fonte de nitrogênio	22
3.3.5. Agitação	22
3.4. INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE SURFACTANTES NA FERMENTAÇÃO PARA PRODUZIR ENZIMAS LIPOLÍTICAS	23
3.4.1. Triton X	23
3.4.2. Tween	24
3.4.3. PEG (Polietileno-Glicol)	25
3.5. PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	26
3.6. SECAGEM DE ENZIMAS	28
3.6.1. Liofilização	29
3.6.2. Secagem Infravermelho	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1. MATERIAIS	33
4.1.1. Microrganismo	33
4.1.2. Reagentes	34

4.1.3. Equipamentos _____	34
4.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL _____	34
4.2.1. Fermentação submersa _____	36
4.2.2. Influência da Concentração do Indutor Óleo de Coco _____	36
4.2.3. Influência do pH e da Temperatura _____	36
4.2.4. Influência da Adição de Surfactantes _____	37
4.2.5. Pré-Purificação Enzimática _____	38
4.2.6. Secagem Enzimática _____	38
4.3. METODOLOGIA ANALÍTICA _____	39
4.3.1. Concentração de Proteínas _____	39
4.3.2. Concentração de Amido _____	39
4.3.3. Atividade Lipolítica _____	39
4.3.4. Concentração de Massa Celular Seca (X) _____	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	41
5.1. Influência da Concentração do Óleo de Coco como Indutor _____	42
5.2. Influência do pH e da Temperatura _____	47
5.2.1. Estudo Cinético da Fermentação Submersa _____	48
5.2.2. Resultados do Planejamento de Experimentos _____	53
5.3. Influência da Adição de Surfactantes ao Meio de Cultura _____	57
5.3.1. Perfil Cinético da Produção de Enzimas Lipolíticas na Presença de Surfactantes _____	57
5.3.2. Resultados do Planejamento de Experimentos para o Estudo da Influência de Surfactantes na Fermentação para a Produção de Enzimas Lipolíticas. _____	60
5.5. Pré-Purificação _____	68
5.6. Secagem de Enzimas _____	71
6.0. CONCLUSÃO _____	75
7.0. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS _____	76
8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	77
9. ANEXOS _____	87
ANEXO 9.1 _____	87
ANEXO 9.2 _____	88
ANEXO 9.3 _____	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Hidrólise seqüencial dos grupos acila no glicerídeo, catalisada por lipases (MENDES et al., 2005).	6
Figura 3.2. Reações catalisadas por lipases do tipo não-específica e 1,3 específica (PAQUES & MACEDO, 2006).	11
Figura 3.3: Etapas do processo de secagem enzimática.	29
Figura 3.4: Diagrama de fases da água. (BOSS, 2004a).....	30
Figura 4.1. Fotografia do microrganismo, com objetiva de 100 X (Biopetro 4).	33
Figura 4.2. Fluxograma do processo de obtenção de enzimas lipolíticas.	35
Figura 5.1. Perfil da atividade lipolítica, da biomassa e do amido, utilizando o óleo de coco como indutor a 1%.	43
Figura 5.2. Perfil da atividade lipolítica, da biomassa e do amido, utilizando o óleo de coco como indutor a 2%.	43
Figura 5.3. Perfil da atividade lipolítica, da biomassa e do amido, utilizando o óleo de coco como indutor a 3%.	44
Figura 5.4. Perfil da atividade lipolítica, da biomassa e do amido, utilizando o óleo de coco como indutor a 4%.	45
Figura 5.5. Perfil do pH com as concentrações de 1%, 2%, 3% e 4% de óleo de coco como indutor, com temperatura de 30°C e pH 5,0.	47
Figura 5.6. Resultados da fermentação para a produção de enzima lipolítica à temperatura de 24°C e pH 3,0 (Ensaio 1) e pH 7,0 (Ensaio 2).	49
Figura 5.7. Resultados da fermentação para a produção de enzima lipolítica à temperatura de 37°C e pH 3,0 (Ensaio 3) e pH 7,0 (Ensaio 4).....	51
Figura 5.8. Perfil da atividade lipolítica, da biomassa e do amido, utilizando pH 5,0 e T=30°C, (Ensaio 5, 6 e 7).	52
Figura 5.9. Perfil do pH com relação ao tempo.	53
Figura 5.10. Superfície de Resposta para o estudo de avaliação da temperatura e pH ótimos para a produção de enzimas lipolíticas.....	55
Figura 5.11. Resultados da fermentação para a obtenção de enzimas lipolíticas em presença de 1% de Triton X (Ensaio 1), Tween 80 (Ensaio 2) e PEG (Ensaio 3).	58

Figura 5.12. Resultados da fermentação para a produção de lípase utilizando 0,2% de Triton X-100. (Ensaio 1) e 0,2% de Tween 80. (Ensaio 2).....	61
Figura 5.13. Resultados da fermentação para a produção de enzima lipolítica utilizando 1,0% de Triton X-100. (Ensaio 3) e 1,0% de Tween 80. (Ensaio 4).	63
Figura 5.14. Resultados da fermentação para a produção de enzima lipolítica utilizando 0,6% de de Triton X-100. (Ensaio 5 e 7) e de Tween 80. (Ensaio 6 e 8)	65
Figura 5.15. Superfície de Resposta para o estudo de.....	68
avaliação da concentração dos surfactantes Tween e Triton X-100.	68
Figura 5.16. Variação da temperatura do produto durante a secagem em relação ao tempo..	71
Figura 5.17. Teor de umidade adimensional em função do tempo, para a temperatura da fonte de 65°C	72
Figura 5.18: Teor de umidade adimensional em função do tempo, parametrizado nas temperaturas da fonte de aquecimento.	72
Figura 5.19. Taxa de secagem em função do teor de umidade em base seca, para diferentes temperaturas..	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Microrganismos produtores de enzimas lipolíticas.	9
Tabela 3.2. Fontes microbianas e seus respectivos fornecedores.....	12
Tabela 3.3. Exemplos de aplicações industriais de enzimas lipolíticas.	13
Tabela 4.1. Meio de Cultura.....	36
Tabela 4.2. Matriz do planejamento fatorial 2^2 empregado no estudo da influência da temperatura e do pH.	37
Tabela 4.3. Matriz do planejamento fatorial 2^2 empregado no estudo da influência da concentração e do surfatante.	37
Tabela 5.1. Apresentação Geral dos Ensaio Realizados.....	41
Tabela 5.2. Atividade enzimática em função da concentração de indutor óleo de coco.....	46
Tabela 5.3. Resultado do planejamento de experimentos para averiguação do efeito do pH e temperatura na produção de enzimas lipolíticas	48
Tabela 5.4. Estimativas de Efeito calculadas no estudo de avaliação da temperatura e pH ótimos para a produção de enzimas lipolíticas.....	54
Tabela 5.5. Análise de variância para o estudo de avaliação da temperatura e pH para a produção de enzimas lipolíticas.	55
Tabela 5.6. Melhores resultados da fermentação com e sem adição de surfactantes para a produção de lípase a 37°C e pH 7,0.....	59
Tabela 5.7. Planejamento de experimentos com diferentes concentrações de surfactantes....	60
Tabela 5.8. Estimativas de Efeito calculadas no estudo de avaliação da concentração dos surfactantes Tween e Triton X-100.....	66
Tabela 5.9. Análise de variância para o estudo de avaliação da concentração dos surfactantes Tween e Triton X-100.....	67
Tabela 5.11. Atributos da qualidade do produto em diferentes condições de secagem.....	74

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

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

Objetivos Específicos

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

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. ENZIMAS

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

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

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

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

fazendo com que a enzima passe de uma conformação ativa a uma conformação desprovida de atividade. No entanto a desnaturação das enzimas pelo calor só ocorrerá dependendo da duração e da intensidade do tratamento térmico.

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

3.1.1. Enzimas Lipolíticas

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

As enzimas lipolíticas são biocatalisadores responsáveis por catalisar reações de hidrólise de ésteres de triglicerídeos. Tais reações ocorrem por clivagem sequencial dos grupos acila no glicerídeo, contendo na mistura reacional água, glicerol, ácidos graxos livres, monoacilgliceróis e diacilgliceróis, (Figura 3.1).

Um elevado número de compostos de alta e baixa massa molecular também pode ser substrato dessa enzima, tais como tioésteres, amidas, poli-hidroxiésteres/hidroxiácidos, etc. Além da hidrólise, elas também são capazes de catalisar reações reversas, como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolises e acidólises), aminólise (síntese de amidas) e lactonização, sendo que a atividade de água do meio reacional é um dos fatores determinantes para cada classe de reação (MENDES *et al.*, 2005; PAQUES & MACEDO, 2006).

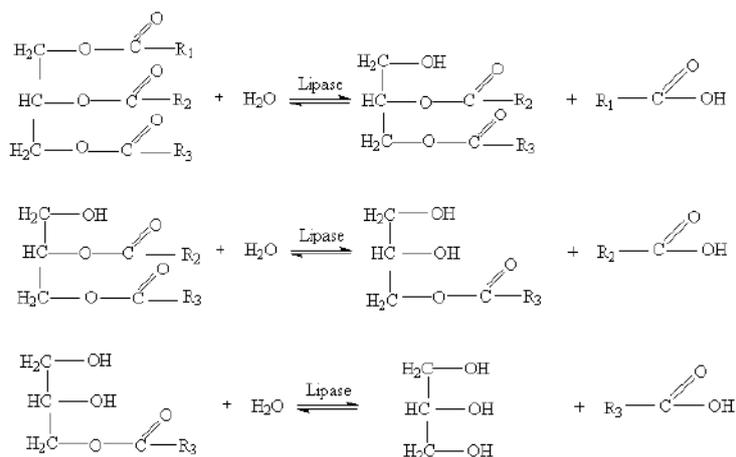


Figura 3.1. Hidrólise seqüencial dos grupos acila no glicerídeo, catalisada por lipases (MENDES *et al.*, 2005).

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

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

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

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

3.1.2. Vantagens das Enzimas Lipolíticas

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

De acordo com PANDEY & BENJAMIN (2000) as enzimas lipolíticas são muito utilizadas como biocatalisador na síntese de compostos quirais, oferecendo grande potencial na produção de compostos farmacêuticos de interesse.

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

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

3.1.3. Enzimas Lipolíticas de Origem Microbiana

As enzimas lipolíticas são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação submersa (FSm) ou fermentação em estado sólido (FES) usando várias espécies de microrganismos (Tabela 3.1), tais como os fungos *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum sp*, por leveduras de *Tulopsis sp* e *Candida sp* e bactérias como *Pseudomonas sp*, *Achromobacter sp* e *Staphylococcus sp* (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). De acordo com SHARMA *et al.* (2001), a maioria das enzimas lipolíticas microbianas industriais são derivadas de fungos e bactérias. As enzimas lipolíticas microbianas são amplamente diversificadas nas suas propriedades enzimáticas, substrato e especificidade, o que as tornam muito atraentes para aplicações industriais (HASAN *et al.*, 2006).

Tabela 3.1. Microrganismos produtores de enzimas lipolíticas.

Fonte	Tipo de Fermentação	Referências
<i>Fusarium solani</i> FS1	FSm	MAIA <i>et al.</i> (1999)
<i>Rhizopus homothallicus</i>	FSm/FES	DIAZ <i>et al.</i> (2006)
<i>Penicillium restrictum</i>	FSm/FES	CASTILHO <i>et al.</i> (2000)
<i>Rhizopus sp</i>	FSm	PASTORE <i>et al.</i> (2003)
<i>Aspergillus niger</i>	FSm	KAMINI <i>et al.</i> (1998)
<i>Candida rugosa</i>	FSm	DALMAU <i>et al.</i> (2000)
<i>Candida rugosa</i>	FSm	FADILOGLU <i>et al.</i> (2002)
<i>Candida rugosa</i>	FSm	RODRIGUES (1996)
<i>Aspergillus niger</i>	FSm	MAHADIK <i>et al.</i> (2004)

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

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

Os microrganismos apesar da sua versatilidade são bastante sensíveis às condições do ambiente ao qual estão sendo submetidos. Na produção de enzimas lipolíticas microbianas, fatores como composição do meio, temperatura, pH, aeração e a presença de compostos inibidores influenciam no processo, afetando a atividade enzimática. Uma grande variedade de microrganismos tem habilidade de produzir essas enzimas, sendo função de

alguns parâmetros reacionais e apresentando diferentes especificidades, massa molecular, sensibilidade à temperatura e pH (BURKERT, 2003).

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

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

3.1.4. Classificação de Enzimas Lipolíticas

De acordo com PAQUES & MACEDO (2006) e BURKERT (2003), as enzimas lipolíticas são divididas conforme a especificidade da enzima, da seguinte forma:

I. Regiosseletivas (Figura 3.2):

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

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

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

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

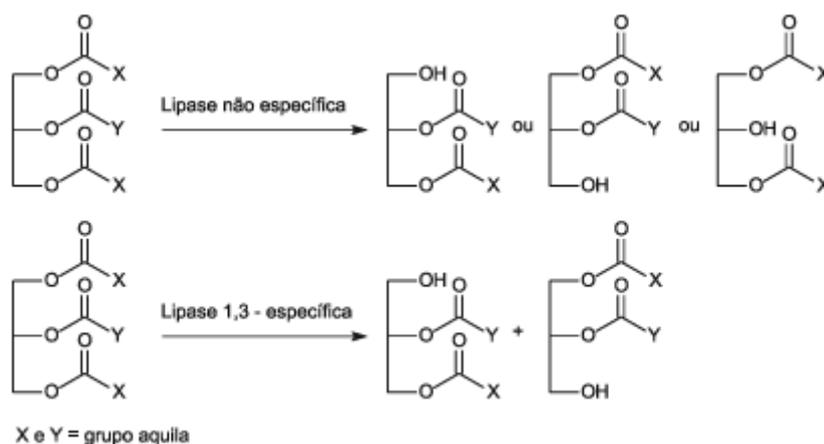


Figura 3.2. Reações catalisadas por lipases do tipo não-específica e 1,3 específica (PAQUES & MACEDO, 2006).

3.1.5. Aplicações das Enzimas Lipolíticas

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

Dentre os processos bioquímicos reportados na literatura, as enzimas lipolíticas representam cerca de 10% entre as enzimas empregadas. No entanto, mesmo com uma vasta variedade de enzimas lipolíticas microbianas, o uso dessas enzimas em escala industrial (Tabela 3.2 e 3.3) ainda é escasso, devido aos elevados custos de produção (GHANDI, 1997).

Na Tabela 3.2, apresentam-se diferentes fornecedores para as diversas fontes microbianas para a produção de enzimas lipolíticas.

Tabela 3.2. Fontes microbianas e seus respectivos fornecedores.

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

Fonte: PAQUES & MACEDO, 2006

Na Tabela 3.3, apresentam-se alguns exemplos de aplicações industriais de enzimas lipolíticas.

Tabela 3.3. Exemplos de aplicações industriais de enzimas lipolíticas.

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

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

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

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

Tratamento de Efluentes

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

Indústria Oleoquímica e de Gordura

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

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

Indústria de Papel e Celulose

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

Indústria de Alimentos

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

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

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

Indústria Têxtil

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

Indústria de Detergentes

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

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

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

Indústria de Cosméticos

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

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

3.2. PROCESSOS FERMENTATIVOS

Os processos fermentativos constituem um dos métodos mais antigos e extremamente utilizados para a produção de enzimas pelo qual os microrganismos, geralmente bactérias, fungos e leveduras, retiram do meio em que estão acondicionados, o material necessário para a sua subsistência, ao mesmo tempo em que as enzimas catalisam substâncias que serão empregadas em processos industriais. Dentre os processos fermentativos utilizados, têm-se a fermentação submersa, onde o meio no qual se desenvolve o microrganismo é líquido e a fermentação em estado sólido onde o meio utilizado, é sólido.

3.2.1. Fermentação Submersa

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

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

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

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

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

DIAZ *et al.* (2006), obtiveram uma atividade específica de 203 U/g, no seu estudo de produção de lipase pelo fungo termotolerante *Rhizopus homothallicus* em fermentação submersa com condições iniciais: 40° C, agitação de 170 rpm, pH de 6,5 e utilizando como meio de cultura: 40 g/L da água de maceração do milho; 10 g/L de peptona; 14 g/L de KH_2PO_4 ; 2,4 g/L de K_2HPO_4 ; 0,4 g/L de MgSO_4 .

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

Com base nos resultados dos experimentos preliminares obtidos por CARVALHO *et al.* (2008) observou-se que a produção de enzimas lipolíticas utilizando diferentes óleos vegetais apresentou maior atividade lipolítica na presença de óleo de coco. NOOR *et al.*

(2003), entre outros pesquisadores, afirmam que a composição destes ésteres metílicos, óleos vegetais, interferem na afinidade da reação enzimática.

3.2.2. Fermentação em Estado Semi-Sólido

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

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

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

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

3.3. INFLUÊNCIA DO MEIO NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS

As numerosas variáveis que envolvem o processo de obtenção da enzima vão desde a composição do meio (fonte de carbono, fonte de nitrogênio, sais e indutores) até às condições operacionais como pH, temperatura, agitação e aeração (BURKERT *et al.*, 2003). Isto ocorre, segundo BORZANI *et al.* (2001), devido à estrutura e a forma do sítio ativo da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura protéica.

3.3.1.pH

Entre os parâmetros físicos-químicos, o pH do meio de crescimento desempenha uma função importante por induzir mudanças morfológicas no organismo e também para a secreção enzimática. A mudança de pH observada durante o crescimento de um organismo também afeta a estabilidade do produto no meio. Em processos com fungos, a capacidade tamponante de alguns constituintes do meio, em certos casos, elimina a necessidade de controle do pH (GUPTA *et al.*, 2004).

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

PASTORE *et al.*(2003), em seu estudo para purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp*, testaram para o efeito do pH na atividade enzimática, diferentes soluções tampões com variadas faixas de pH: tampão acetato de sódio: pH= 3,6; 4,0; 4,5; 5,0 e 5,6; tampão fosfato de sódio: pH=6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 e tampão Tris-HCl: pH=8,0; 8,5 e 9,0. Após análises do extrato bruto contendo os três tampões diferentes, chegaram à conclusão que a maior atividade enzimática estava presente na faixa de pH entre 6,0 e 6,5.

3.3.2. Temperatura

A influência da temperatura na cinética da reação enzimática deve ser entendida em duas fases distintas: em princípio, aumentos de temperatura levam a aumentos de

velocidade de reação, por aumentar a energia cinética das moléculas dos componentes do sistema, aumentando a probabilidade de choques efetivos entre elas. Esse efeito é observado em um intervalo de temperatura compatível com a manutenção da estrutura espacial da enzima.

Temperaturas mais altas levam à desnaturação da enzima, um dos motivos para a elevação da temperatura é a agitação mecânica, etc. Temperaturas elevadas causam a perda da estrutura nativa das enzimas por alterarem as ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional. A desnaturação é causada pelo rompimento das ligações de hidrogênio, que são bastante termolábeis, desencadeando uma cascata de alterações estruturais, levando a enzima a uma nova conformação ou a um estado sem estrutura definida; a enzima é dita, desnaturada. A temperatura que provoca a desnaturação naturalmente varia para a cadeia proteica, mas, geralmente, está pouco acima da sua temperatura ótima (BORZANI *et al.*, 2001).

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

3.3.3. Fonte de carbono

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

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

DALMAU *et al.* (2000), analisando os efeitos das fontes de carbono na produção de lipase por *Candida rugosa* utilizaram um meio basal composto por 15 g/L de KH_2PO_4 , 5,5 g/L de K_2HPO_4 , 5 g/L de $\text{Mg SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L de NaCl , 0,1 g/L de CaCl_2 . As fontes de carbono utilizadas para uma concentração de 2 g/L foram: ácido oléico, ácido palmítico, Tween 80 e trioleína. Após os testes verificaram que o ácido palmítico foi o melhor indutor para a produção da enzima nas condições de 30°C, 150 rpm em 48 horas de fermentação, gerando cerca de 5,3 U/mL.

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

3.3.4. Fonte de nitrogênio

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

FADILOGLU *et al.* (2002), no estudo dos efeitos das fontes de carbono e nitrogênio na produção de lipase por *Candida rugosa*, utilizaram como fonte de carbono, glicose e frutose e como fonte de nitrogênio, extrato de levedura, triptona, e protease-peptona. A fermentação foi monitorada por 72 horas e foram avaliados os efeitos do material lipídico na produção de lipase com e sem azeite de oliva, em diferentes composições das fontes de carbono e nitrogênio. A maior atividade da lipase foi observada no meio que continha o azeite de oliva como indutor e extrato de levedura e protease-peptona como fonte de nitrogênio. Os autores chegaram à conclusão que os melhores resultados foram com o meio contendo o óleo de oliva como fonte de carbono, na presença de fontes de nitrogênio, como extrato de levedura, tritona e a protease-peptona.

3.3.5. Agitação

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

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

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

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

Os surfactantes possuem como principal característica diminuir a tensão interfacial entre o meio de cultura e o óleo (indutor). Isto é, como as partículas do óleo com a adição de surfactantes tornam-se menores, fica mais fácil para o microrganismo digeri-lo.

A adição de surfactantes no meio de cultura tem sido amplamente utilizada para que possam ocasionar alterações na permeabilidade da parede celular ou efeitos na estrutura da enzima (SAXENA *et al.*, 1999 e CORZO & REVAH, 1999).

3.4.1. Triton X

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

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

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

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

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

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

3.4.2. Tween

O Tween 80 (polioxietileno sorbitano monooleate) é geralmente considerado como um surfatante que pode ser utilizado como substrato para a produção de lipases e esterases. Em trabalhos recentes o Tween 80 demonstra ser uma poderosa fonte de carbono para a

produção de lipases microbianas, podendo também diminuir significativamente o tempo da fermentação (DALMAU *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2001).

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

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

3.4.3. PEG (Polietileno-Glicol)

As modificações químicas causadas pelos derivados de polietilenoglicol (PEG) nas enzimas e outras moléculas bioativas podem eliminar alguns inconvenientes das biomoléculas ou dar novas funções nos processos biotecnológicos. O surfatante PEG torna-se solúvel e ativo em solventes orgânicos a fim de que as reações reversas de hidrólise procedam de forma eficaz, não só em meio orgânico, mas também em qualquer solvente, incluindo a síntese de ésteres (MATSUSHIMA, 1996).

NOEL & COMBES (2003), estudaram o efeito do polietileno-glicol (PEG) sobre a estabilidade da lipase de *Rhizomucor miehei*, detectando por meio de um escaner de varredura a existência de dois mecanismos exclusivos do PEG, que levam a estabilização e à desestabilização da lipase de *Rhizomucor miehei*.

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

3.5. PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

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

O êxito da otimização das enzimas depende geralmente do desenvolvimento eficiente dos métodos de separação e purificação. Diferentes técnicas têm sido utilizadas para a purificação de lipases e outras enzimas, entre elas destaca-se a técnica de precipitação onde é aplicado o sulfato de amônia, devido ao seu baixo custo, alta solubilidade e pela sua proteção natural das enzimas. No entanto, algumas outras técnicas como extração do micélio utilizando surfactantes e cromatografia de troca iônica, ganham importância nos últimos anos (KANWAR *et al.*, 2002). De acordo com DIAZ *et al.* (2006), os progressos nos estudos sobre as propriedades moleculares da lipase têm sido limitados devido à falta de procedimentos experimentais adequados para a obtenção de uma enzima altamente purificada.

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

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

O método de separação por precipitação de enzimas por salificação (*salting-out*) é um método acessível e de baixo custo. Em concentrações reduzidas, os sais aumentam a solubilidade de muitas enzimas (proteínas), um fenômeno denominado solubilização por salificação (*salting-in*). Isso ocorre devido aos íons ficarem em volta das proteínas (íons de carga oposta), resultando numa diminuição da energia eletrostática e num aumento da atividade do solvente, que por sua vez, leva ao aumento da solubilidade do solvente USA

(2008a; 2008b). Por outro lado, à medida que a força iônica é aumentada, isto é, a quantidade de íons de sal aumenta, a solubilidade do solvente diminui causando a redução gradativa da proteína. Com forças iônicas suficientemente elevadas, uma proteína pode ser quase completamente precipitada de sua solução, um efeito denominado precipitação por salificação (*salting-out*) (LEHNINGER, 1993; USA, 2008a).

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

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

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

ABBAS *et al* (2002), com a finalidade de estudar o isolamento e a caracterização de uma lipase extracelular de uma cepa isolada de *Mucor sp* de palma de frutas, utilizaram para a precipitação da proteína 75% de sulfato de amônio (m/v) a 0° C, obtendo uma atividade lipolítica específica de 129 U/g e um rendimento total de 99%. Uma atividade específica semelhante foi verificada no estudo de CASTILHO *et al* (2003) para a purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp*, onde utilizaram o sulfato de amônio a 70% para a precipitação e obtiveram uma atividade específica de 103 U/g.

DIAZ *et al.* (2006), para o procedimento de purificação de lipase do fungo *Rhizopus homothallicus*, adicionaram ao meio de cultura uma concentração de 1 M de sulfato de amônio, sendo o pH do meio ajustado para 8,0. O meio de cultura foi centrifugado a 10,000 x g por 25 minutos com temperatura de 4° C. O sobrenadante foi aplicado numa coluna de butil-sepharose (2,5cm x 30cm) equilibrada com 20 mM de tampão tris-HCL (pH 8,0) contendo 1 M de sulfato de amônio (tampão A). A coluna foi lavada 10 vezes

com a solução tampão A para remover qualquer material que não fosse proteína. As lipases foram diluídas num gradiente de concentração de sulfato de amônio que variou de 1 a 0 M em 20 mM do tampão tris-HCL (pH 8,0) ao longo de colunas sendo 10 mL das frações coletados numa taxa de 2 mL/min. As frações da amostra contendo atividade lipásica passaram finalmente por um cromatógrafo contendo uma solução 10 mM de tris-HCL (pH 8,0) e 150 mM NaCL, a 1 mL/min. Todos os passos da purificação ocorreram a 4°C, sendo as frações que continham atividade lipásica foram armazenadas a -20°C. A atividade lipolítica aumentou com a biomassa, atingindo o máximo no final da fase exponencial de crescimento, decrescendo em seguida, atingindo o valor máximo de 50 U/mL em 22 horas de fermentação, o que corresponde a cerca de 6 mg/L de enzima pura.

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

3.6. SECAGEM DE ENZIMAS

A secagem é um processo amplamente empregado na transformação de materiais bioativos, como: gêneros alimentícios, laticínios, remédios, suspensões químicas e bioquímicas que contêm enzimas, proteínas, anticorpos e vitaminas. Pode ser considerada como uma técnica que tem por objetivo garantir em longo prazo a preservação, a estabilidade e as propriedades originais dos produtos biológicos (CHEN *et al.*, 2007; ABDELWAHED, 2006). Segundo FRANKS (1998), uma série de reações químicas em soluções aquosas podem ocorrer com algumas substâncias como peptídeos, proteínas e moléculas orgânicas com complexos sintéticos, muitas das quais são completamente

inaceitáveis em termos de segurança e desempenho do produto, já que reduz a atividade específica da enzima e causa oxidação.

Um dos métodos mais utilizados para a secagem de enzimas é o método conhecido como freeze drying, no qual a secagem é feita por meio da liofilização. É considerado um processo pelo qual o solvente (água ou soluções) é removido de um material ou solução congelada por sublimação ou dessorção do solvente, ocorrendo geralmente sob pressão reduzida. Este processo envolve as seguintes fases: congelamento, secagem primária e secagem secundária, Figura 3.3 (BOSS, 2004b).

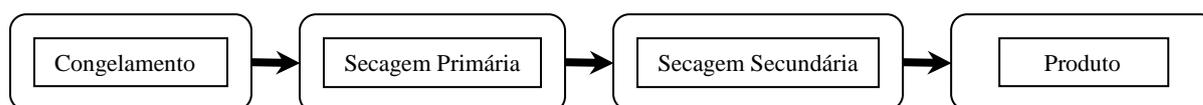


Figura 3.3: Etapas do processo de secagem enzimática.

O processo de secagem de enzimas possui algumas vantagens em comparação com os processos de secagem convencionais, como: a estrutura do material permanece intacta; a umidade é removida a baixa temperatura; a estabilidade do produto durante o armazenamento é mantida; e a rápida transição do produto de um estado físico para outro minimiza a degradação da enzima (BOSS, 2004).

De acordo com CARPENTER *et al.* (1990; 1993), há uma grande variedade de solutos que podem proteger as proteínas durante o processo de congelamento e descongelamento. Estes produtos são soluções químicas como, açúcares, aminoácidos, metilaminas, polióis, etc. Isso se deve porque os produtos fazem com que as proteínas não entrem em contato com a solução aquosa. No entanto outros aspectos devem ser levados em consideração já que a qualidade e a aparência do produto irá depender também da composição, da concentração, do volume da solução que será feita a secagem, da geometria do recipiente, de vários equipamentos do processo e dos parâmetros como: temperatura e transferência de massa (FRANKS, 1998).

3.6.1. Liofilização

A liofilização consiste basicamente num processo de separação por sublimação, isto é, a água ou o substrato aquoso, que deve estar na fase sólida, é removida na forma de vapor da substância congelada, ou seja, passa da fase sólida direto para a fase vapor. Para que isto se torne possível é necessário que a zona da temperatura de sublimação esteja

abaixo do ponto triplo demonstrado na Figura 3.4. O ponto triplo da água ocorre a uma temperatura de 273,15 K e a uma pressão de 639,95 Pa. Grande parte dos liofilizadores trabalham a -10°C ou a uma pressão absoluta de aproximadamente 266,65 Pa.

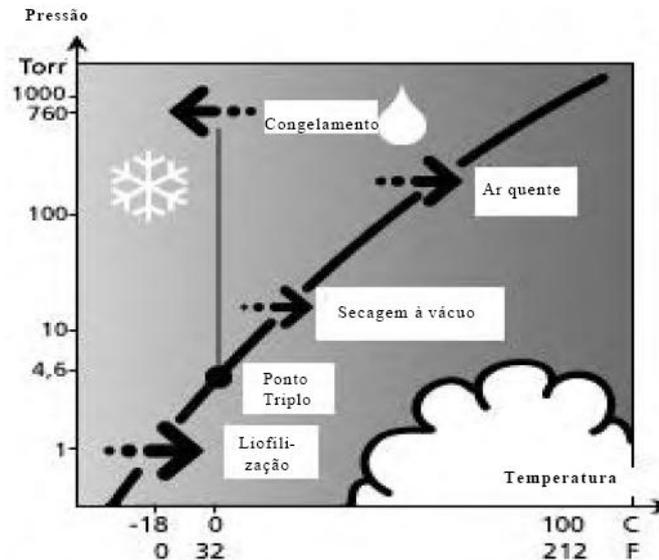


Figura 3.4: Diagrama de fases da água. (BOSS, 2004a)

O método de liofilização tem como objetivo preservar a qualidade do produto, deixando o soluto ou o substrato em sua forma anidra ou quase anidra, mas para que isso ocorra é fundamental que a estrutura onde ocorra a sublimação esteja rígida pelo congelamento da superfície do material. Esta rigidez é importante para prevenir colapsos da matriz sólida após a secagem. (BOSS, 2004a e FRANKS, 1998).

Mecanismo do Liofilizador

Basicamente num liofilizador encontram-se três componentes essenciais: a bomba de vácuo (para remover o ar e o vapor d' água), um condensador (para repor o calor latente perdido) e a câmara de vácuo. De acordo com JAYARAMAN (1995), podem ocorrer num sistema de "freeze drying":

- transferência de calor e massa através do mesmo caminho, em direções opostas;
- transferência de calor que ocorre através da camada congelada e a transferência de massa que ocorre através da camada de secagem;

- a geração do calor ocorre dentro do gelo (por microondas) e a transferência de massa através da camada de secagem.

Segundo BOSS (2004), a cinética do processo de liofilização é determinada pelo transporte interno de calor do material secado e umidade sublimada na forma de vapor e também pelo transporte de vapor na superfície do material. Se a água for colocada numa câmara de vácuo, conectada a uma bomba de grande capacidade e a concentração de moléculas acima da superfície do líquido for reduzida por bombeamento, a chance das moléculas que deixaram a superfície do líquido retornarem é muito pequena. Isto pode ser percebido a partir do fato de que se uma molécula não retorna, seu calor latente de vaporização se perde e a temperatura do líquido cai.

No seu estudo de investigação da estabilização da secagem enzimática de lisozimas e formulação das suas propriedades físicas, LIAO *et al.* (2004), utilizaram para o preparo da secagem enzimática solução tampão de fosfato de sódio (10 mM, pH 6,3) e a solução de lisozima (10,0 mg/mL) que foi misturada com um volume igual da solução tampão. As amostras foram congeladas a - 80°C, transferidas para o liofilizador e processadas, isto é, passou pela secagem primária a uma temperatura de - 30°C, pressão de 20 Pa, durante 40 horas e pela secagem secundária a uma temperatura de - 20°C, pressão de 10 Pa, durante 20 horas. A temperatura do produto foi monitorada utilizando termopares que foram posicionados na parte inferior dos frascos. Chegando a conclusão que a lisozima permaneceu com o seu estado inicial inalterado, isto é, ficou estável mesmo depois da secagem enzimática.

YASUDA *et al.* (2001), com objetivo de verificar a ação de diferentes aditivos que pudessem reforçar a atividade de transesterificação na secagem da enzima lipase, utilizaram na etapa de secagem de enzimas uma solução tampão de fosfato de potássio contendo 10mM (pH 5,5), contendo 3,5 mg de lipase. A solução foi misturada com um agitador magnético, congelada e liofilizada. O pó resultante pós-liofilização foi analisado obtendo uma atividade de transesterificação máxima de 0,405 KU/g.lipase para o uso do aditivo Triton X-100.

TSINONTIDES *et al.* (2004), apresentaram no seu estudo de princípios e práticas para o sucesso da secagem de enzimas em indústria, os parâmetros utilizados para a otimização do processo de secagem de enzimas, o qual utilizaram na etapa primária, temperaturas de -20°C, -21°C e -22°C e pressões de 9,5 Pa, 11 Pa e 12,5 Pa. Já na etapa secundária foram utilizadas temperaturas de 39° a 51°C, 40° a 60°C e 41° a 61°C e pressões

de 3,5 Pa, 5,0 Pa e 6,4 Pa. Chegando a conclusão que o monitoramento da temperatura do produto dentro dos liofilizadores durante o processo é uma metodologia para assegurar o êxito. Sendo que a definição dos pontos de pressão e temperatura podem se apresentar ineficientes uma vez que diferentes unidades industriais poderão ter diferentes temperaturas, independente da sua dimensão, produzindo assim, taxas de transferência de calor para o produto diferenciadas.

3.6.2. Secagem Infravermelho

A literatura reporta que a secagem de enzimas por infravermelho é um método pouco pesquisado pelos autores. Sendo necessário o emprego de mais pesquisas na área para um melhor embasamento teórico do método.

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

GLOUANNEC *et al.* (2002) define o infravermelho como um modo superficial de aquecimento, que permite uma imediata e significativa fonte de energia para o produto, otimizando o processo com a redução do tempo de secagem e dos custos.

Em seu estudo experimental da secagem por infravermelho-convectivo de sulfato ferroso hidratado, GLOUANNEC *et al.* (2002) afirmam que uma alta potência do infravermelho torna possível aumentar consideravelmente a perda de massa no menor tempo possível. Isto pode envolver importantes gradientes de umidade no produto, com a formação de uma crosta sobre a superfície da água o que impede a migração no interior deste produto. A secagem realizada com infravermelho de baixa potência permite uma melhor homogeneidade do produto, contudo há um aumento do tempo de secagem. Para melhorar a qualidade da secagem, o produto deve possuir uma camada fina ou a variação da potência do infravermelho durante a secagem pode ser uma solução para encurtar o tempo desta.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

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

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Microrganismo

A bactéria Biopetro 4 (Figura 4.1), empregada no presente trabalho, pertence ao Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e foi isolado de um solo contaminado por petróleo na região do campo de exploração de petróleo de Carmópolis no Estado de Sergipe. Esta bactéria foi pré-selecionado a partir de estudos, feitos anteriormente pelo grupo de pesquisa de Engenharia de Bioprocessos do ITP, nos quais detectou-se que a bactéria Biopetro 4 apresentava o maior potencial produtor de enzimas lipolíticas dentre as estudadas. O microrganismo foi preservado em tubos com ágar nutriente inclinado e estocados a 4°C, no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB) do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP).

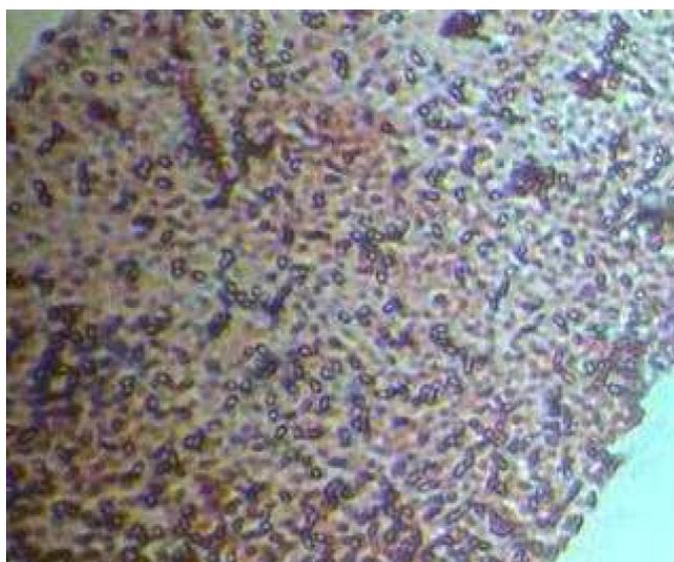


Figura 4.1. Fotografia do microrganismo, com objetiva de 100 X (Biopetro 4).

4.1.2. Reagentes

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

4.1.3. Equipamentos

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

4.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

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

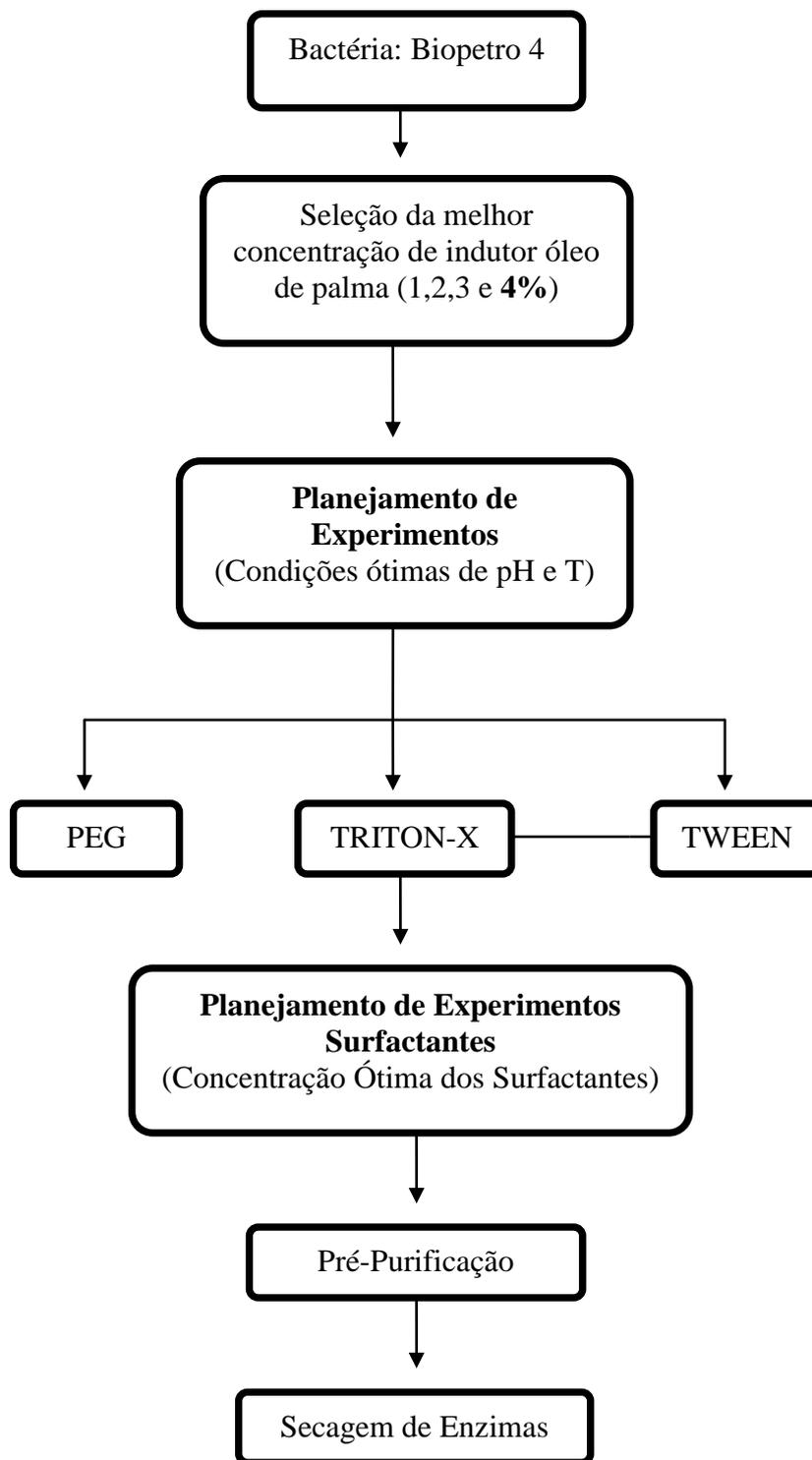


Figura 4.2. Fluxograma do processo de obtenção de enzimas lipolíticas.

4.2.1. Fermentação submersa

A fermentação foi conduzida em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 125 mL de meio de cultura (Tabela 4.1) e diferentes concentrações de óleo de coco como indutor acrescido após 48h de fermentação. Os frascos foram agitados a 170 rpm e temperaturas de 24°C, 30°C e 37°C, em agitador orbital tipo shaker durante 144 horas. Em alguns experimentos foram adicionados surfactantes (PEG 1500, Tween 80 ou Triton X-100) e os valores iniciais de pH da fermentação foram 3,0; 5,0 e 7,0. O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm e 121°C por 15 minutos. Os frascos foram inoculados com 10% de volume de inóculo com 48 h de idade.

Tabela 4.1. Meio de Cultura

Meio de Cultura	Composição (% m/v)
Amido (Synth, USA)	10
Extrato de Levedura (Himedia, Índia)	3,0
KH ₂ PO ₄ (Synth, USA)	0,5
NaNO ₃ (Dinâmica, Brasil)	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O (Synth, USA)	0,25
Peptona Bacteriológica (Himedia, Índia)	0,65

4.2.2. Influência da Concentração do Indutor Óleo de Coco

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

4.2.3. Influência do pH e da Temperatura

Para avaliar a influência do pH e da temperatura na produção das enzimas lipolíticas pelo microrganismo selecionado, foi adotada a metodologia do planejamento de experimentos empregando uma matriz 2² com três pontos centrais (Tabela 4.2). Em todo o planejamento foi

utilizado o mesmo meio de cultura, contendo 4% de óleo de coco, como indutor, acrescido após 48 horas de fermentação. Os experimentos foram feitos em triplicata.

Tabela 4.2. Matriz do planejamento fatorial 2^2 empregado no estudo da influência da temperatura e do pH.

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

X₁: Valores codificados para o pH.

X₂: Valores codificados para a Temperatura.

4.2.4. Influência da Adição de Surfactantes

Para um melhor desempenho da produção de enzimas lipolíticas foram testados os surfactantes PEG 1500, Triton X-100 e Tween 80 na proporção de 1% em relação à quantidade do meio de cultura. O pH do meio e a temperatura utilizadas neste experimento foram os que conduziram aos melhores resultados no item 4.2.3. Após a seleção dos melhores surfactantes, realizou-se um planejamento de experimentos para a verificação da melhor concentração dos surfactantes selecionados Triton X-100 e Tween 80, empregando uma matriz 2^2 com três pontos centrais (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Matriz do planejamento fatorial 2^2 empregado no estudo da influência da concentração e do surfatante.

Ensaio	Níveis Codificados das Variáveis		Valores Reais das Variáveis	
	X ₁	X ₂	Surfactantes	Concentração (%)
1	-1	-1	Triton X-100	0,2
2	+1	-1	Tween 80	0,2
3	-1	+1	Triton X-100	1,0
4	+1	+1	Tween 80	1,0
5	-1	0	Triton X-100	0,6
6	+1	0	Tween 80	0,6
7	-1	0	Triton X-100	0,6
8	+1	0	Tween 80	0,6

X₁: valores codificados para os

X₂: valores codificados para concentração do surfatante

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

4.2.5. Pré-Purificação Enzimática

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

O extrato pré-purificado utilizado foi composto pelo meio de cultura cuja formulação encontra-se apresentada na Tabela 4.2 com a adição do surfatante Triton X-100.

4.2.6. Secagem Enzimática

A secagem das enzimas lipolíticas foi realizada por meio de um secador infravermelho de ondas curtas (0,7 a 1,3 μm). Os experimentos foram conduzidos com temperaturas da fonte de aquecimento infravermelho (IV) de: 40°, 65° e 80°C.

A operação de secagem foi feita em duas etapas: uma etapa de secagem propriamente dita precedida por uma etapa inicial de estabilização do sistema térmico, na qual o equipamento era ligado e o sistema de aquecimento infravermelho regulado para que atingisse a temperatura de operação desejada. Após a estabilização da temperatura, uma placa de Petri contendo 10 mL do material foi exposta à radiação, tendo assim início o processo de secagem.

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

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

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

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

Para a determinação da atividade lipolítica, durante o processo de secagem, uma alíquota (1mL enquanto a amostra estava líquida e 0,5 g da amostra já sólida) foi retirada a cada hora do processo de secagem.

4.3. METODOLOGIA ANALÍTICA

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

4.3.1. Concentração de Proteínas

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

4.3.2. Concentração de Amido

O teor de amido foi dosado utilizando o método colorimétrico de SOCCOL (1992) . Amido foi utilizado como padrão e a densidade ótica foi lida a 620 nm. Para a obtenção da curva de calibração foi utilizado amido.

4.3.3. Atividade Lipolítica

Foi determinada pelo método descrito por SOARES *et al.* (1999). O substrato é composto de óleo de oliva emulsionado com água destilada e goma arábica (7%) na proporção de 50:50. A reação enzimática é formada por 5mL de substrato, 2mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) e 1mL de solução enzimática. A temperatura da

reação foi mantida a 37°C em banho termostático por 5 min sob agitação constante (82 rpm). A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de uma solução de acetona, etanol e água (1:1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução padronizada de KOH 0,04 N, utilizando fenolftaleína como indicador.

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

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

onde:

AE é a atividade lipolítica (U/mL);

V_a é o volume da amostra titulada (mL);

V_b é o volume do branco titulado (mL);

V_c é o volume da amostra utilizada na reação (mL);

N é a normalidade da solução de KOH (mol/L);

t é o tempo de reação em minutos.

4.3.4. Concentração de Massa Celular Seca (X)

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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Tabela 5.1. Apresentação Geral dos Ensaio Realizados

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

5.1. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO ÓLEO DE COCO COMO INDUTOR

Observa-se por meio das Figuras 5.1; 5.2; 5.3 e 5.4 que para todas as concentrações de óleo de coco como indutor as atividades enzimáticas permaneceram praticamente constante após a adição do óleo. A massa celular seca foi timidamente formada com concentração de 1% de indutor, com 2% só é observada uma fase exponencial de crescimento microbiano e com 3% verifica-se que a fase exponencial prolonga-se até 80 h e a fase de morte microbiana é registrada a partir de 100 h. Com a utilização de 4% apenas é observada uma fase estacionária, porém tímida como a do experimento com 2% de indutor. A concentração de amido diminui vertiginosamente nas primeiras 28 h, a partir desse ponto o microrganismo passa a ter contato com o óleo e possivelmente a produzir enzimas lipolíticas para poder quebrá-lo em resíduos menores e assim consumí-lo como fonte de carbono.

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

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

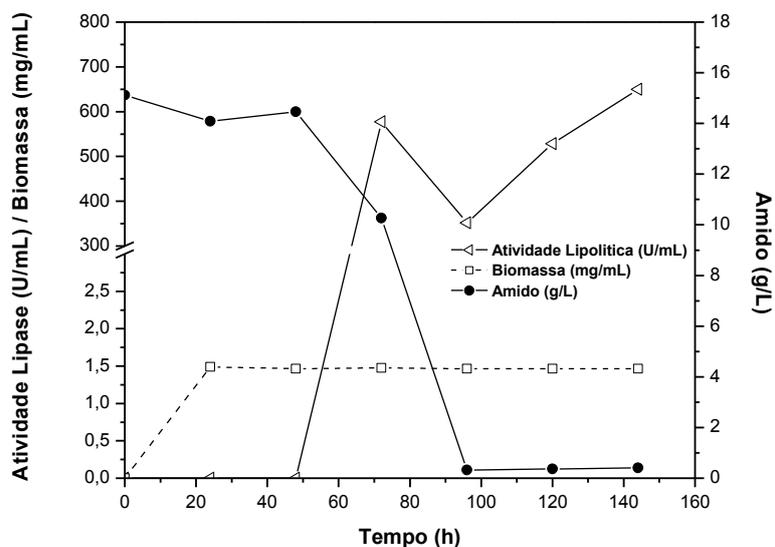


Figura 5.1. Perfil da atividade lipolítica, da biomassa e do amido, utilizando o óleo de coco como indutor a 1%.

No entanto, nas mesmas condições de fermentação variando somente a concentração de 1 para 2% (v/v) do indutor verificou-se que a atividade lipolítica máxima alcançada foi de 1675 U/mL em 120 horas de fermentação (Figura 5.2). GULATI *et al.* (2005) estudaram a produção de lipase por *Fusarium globulosum* em fermentação submersa, na qual a maior produção de enzima foi de 3,85 U/mL, à 30°C e pH 6,2, na concentração de óleo de palma a 2%.

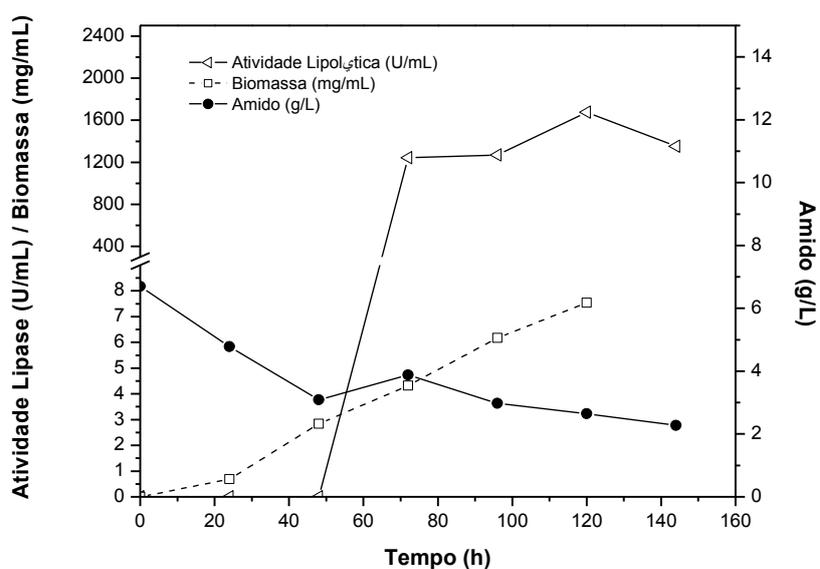


Figura 5.2. Perfil da atividade lipolítica, da biomassa e do amido, utilizando o óleo de coco como indutor a 2%.

No perfil da curva de crescimento microbiano, Figura 5.2, nota-se nas primeiras 24 horas a existência da fase de latência, que segundo BORZANI *et al.* (2005), representa o período de adaptação, para em seguida entrar no período de transição. Após a inserção do indutor a curva entra na fase exponencial (log) até as 120 horas de fermentação, na qual alcança uma produtividade máxima de 7,537 mg/mL. A curva da dosagem de amido apresenta no início da fermentação uma concentração elevada de 6,69 g/L que vai declinando até o período de 48 horas, sendo que logo após a inserção do indutor ocorre a elevação da concentração de amido, demonstrando a adaptação do microrganismo ao indutor oleoso. Após este período, houve um declínio da concentração de amido até a fase final da fermentação. Portanto, com base nos resultados obtidos, deve-se considerar que a produtividade enzimática, possivelmente depende da concentração microbiana e do consumo do substrato, o amido e o óleo de coco.

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

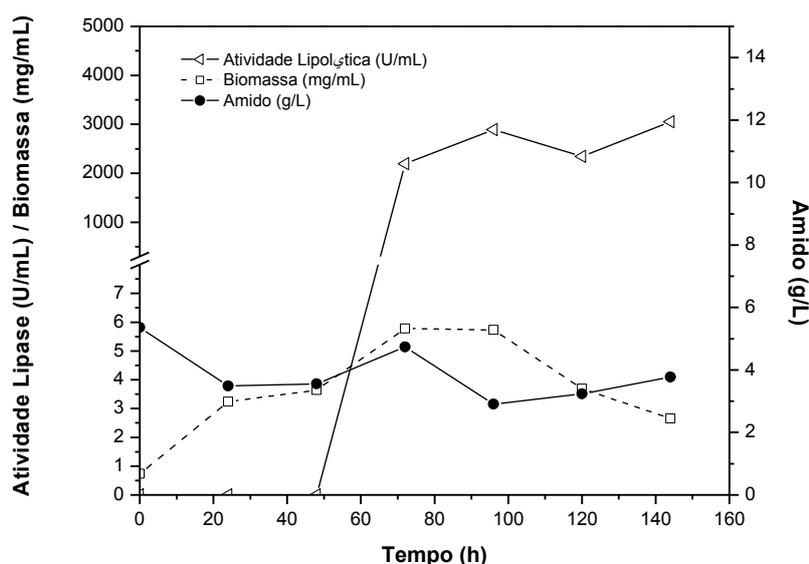


Figura 5.3. Perfil da atividade lipolítica, da biomassa e do amido, utilizando o óleo de coco como indutor a 3%.

Na curva da dosagem de amido pode-se observar, Figura 5.3, que há um decréscimo da concentração no período em que é inserido o indutor óleo de coco, levando a concluir que o microrganismo consumiu uma maior quantidade de amido quando estava em processo de adaptação ao indutor, sendo que logo após esse período o microrganismo adquiriu uma maior afinidade com o indutor oleoso, elevando com isso a concentração da biomassa, que no período de 24 horas até as 72 horas apresentou a fase log, passando logo após a inserção do indutor para a fase estacionária (entre 72 e 96 horas de fermentação), alcançando neste ponto a máxima concentração microbiana de 5,77 mg/mL em 96 horas de fermentação, juntamente com a máxima atividade lipolítica alcançada. A partir dos resultados pode-se concluir, que o crescimento celular e o consumo do substrato, tanto o óleo de coco quanto o amido estão associados, possivelmente, à produtividade enzimática.

Dentre as concentrações testadas (1 a 4%), a atividade lipolítica máxima obtida foi de 3455 U/mL em 120 horas de fermentação utilizando o indutor a 4% (v/v) de concentração, de acordo com a Figura 5.4.

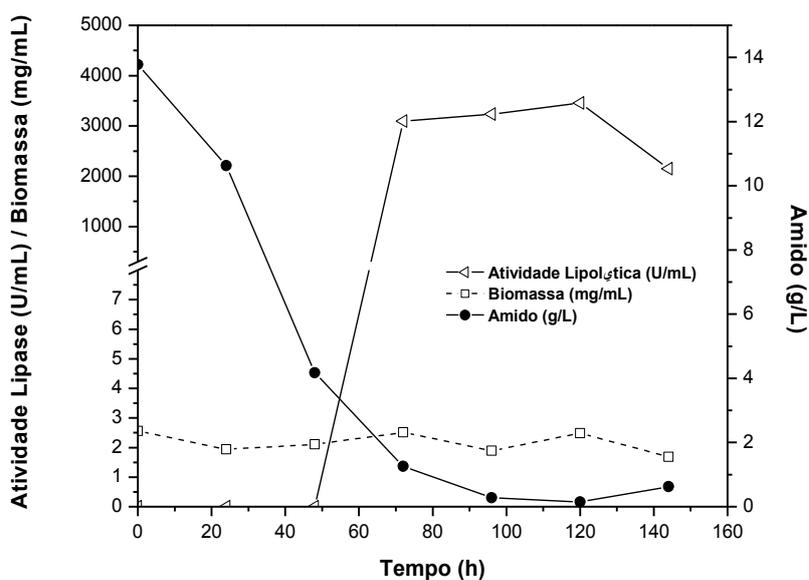


Figura 5.4. Perfil da atividade lipolítica, da biomassa e do amido, utilizando o óleo de coco como indutor a 4%.

Ao contrário do Biopetro 4 que quanto maior a inserção do indutor óleo de coco maior a produção de enzimas lipolíticas, autores como MAHADIK *et al.* (2004), consideraram a concentração de 1% de indutor azeite de oliva como alta para a produção de lipases ácidas pelo microrganismo mutante de *Aspergillus niger* NCIM 1207 em fermentação submersa nas seguintes condições: pH 5,5, à 30°C e agitação que variou entre

150 e 180 rpm. De acordo com os autores o aumento da quantidade de indutor no meio de cultura não é associado à produção de lipase a partir do microrganismo mutante de *Aspergillus Níger*, nos quais testaram concentrações variadas de indutor (1,0%, 2,5% e 5,0%) e obtiveram como resultado as atividades lipolíticas de 25,6 U/mL, 25,6 U/mL e 25,8U/mL, respectivamente.

No perfil da curva de crescimento microbiano, Figura 5.4, observa-se praticamente a fase estacionária do início ao final da fermentação, chegando ao ápice do crescimento celular nas primeiras horas de fermentação com uma concentração de 2,56 mg/mL. No caso da curva da dosagem do amido, apresenta inicialmente elevada concentração de 13,77 g/L, entrando em declínio no decorrer da fermentação, chegando a 0,62 g/L, o qual pode ser explicado pela adaptação do microrganismo tanto ao indutor oleoso quanto ao substrato (amido), demonstrando com isso que a produtividade enzimática, neste caso, está associada possivelmente ao consumo do substrato.

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

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

Tabela 5.2. Atividade enzimática em função da concentração de indutor óleo de coco.

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

A produção das enzimas lipolíticas foi analisada concomitantemente com o perfil do pH. Os resultados estão representados na Figura 5.5, na qual se pode observar o aumento do pH durante as fermentações para todas as concentrações de indutor. PASTORE *et al.* (2003) verificaram maior estabilidade para a produção da lipase de *Rhizopus sp.* na faixa

de 5 a 8, similarmente ao observado nesse estudo. A literatura reporta que pH neutro é geralmente definido como ótimo para a atividade lipolítica, como pode ser verificado nos trabalhos de TAN *et al.* (2003), ABBAS *et al.* (2002), BURKERT (2003), KAMINI *et al.* (1998) e FADILOGLU *et al.* (2002).

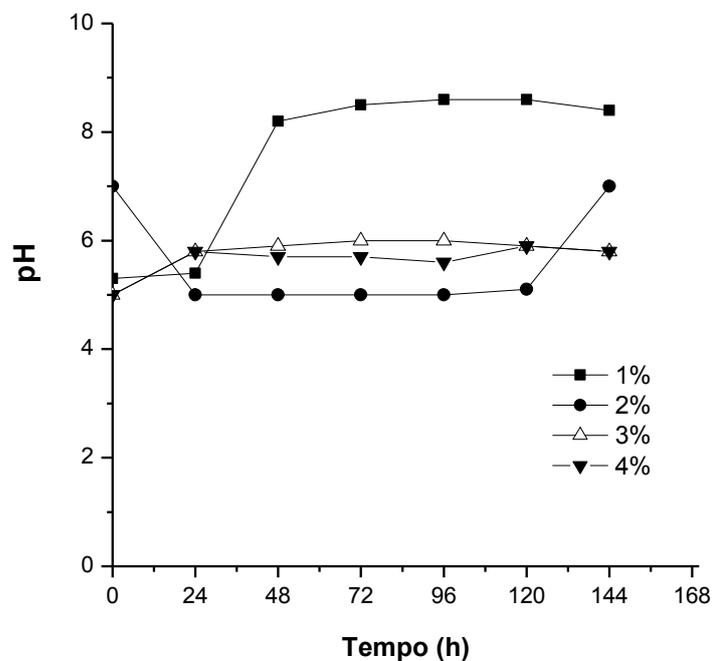


Figura 5.5. Perfil do pH com as concentrações de 1%, 2%, 3% e 4% de óleo de coco como indutor, com temperatura de 30°C e pH 5,0.

5.2. INFLUÊNCIA DO pH E DA TEMPERATURA

Neste item são apresentados e discutidos os resultados provenientes da avaliação dos efeitos do pH e da temperatura na fermentação submersa para a produção de lipase por meio de planejamento fatorial (Tabela 5.3). Foi utilizado um planejamento fatorial completo com pontos axiais para a verificação dos efeitos, onde para uma melhor compreensão, serão apresentados anteriormente, o estudo cinético dos componentes da fermentação: concentração da biomassa, determinação da atividade lipolítica e a dosagem de amido (item 5.2.1).

Tabela 5.3. Resultado do planejamento de experimentos para averiguação do efeito do pH e temperatura na produção de enzimas lipolíticas

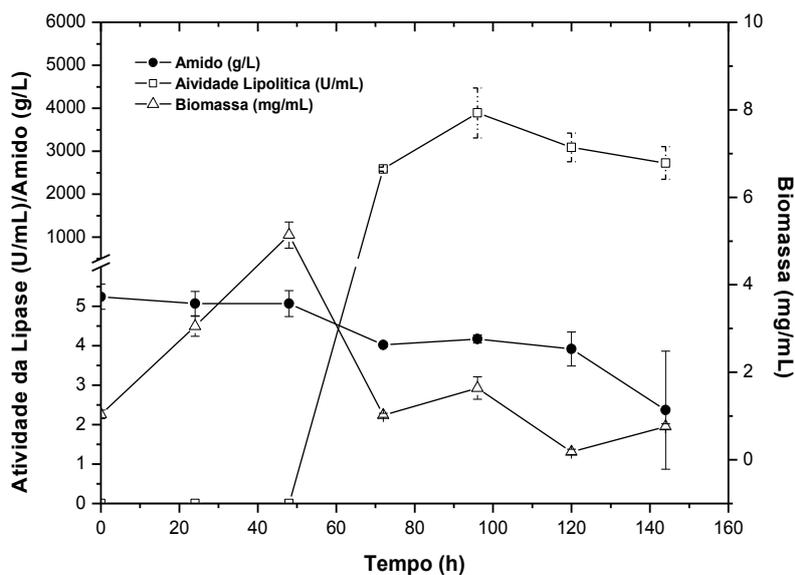
Ensaio	Níveis Codificados das Variáveis		Valores Reais das Variáveis		Atividade Lipolítica (U/mL)
	X ₁	X ₂	pH	T (°C)	
1	-1	-1	3,0	24	3891
2	+1	-1	7,0	24	3749
3	-1	+1	3,0	37	2453
4	+1	+1	7,0	37	4617
5	0	0	5,0	30	3958
6	0	0	5,0	30	4161
7	0	0	5,0	30	4012

5.2.1. Estudo Cinético da Fermentação Submersa

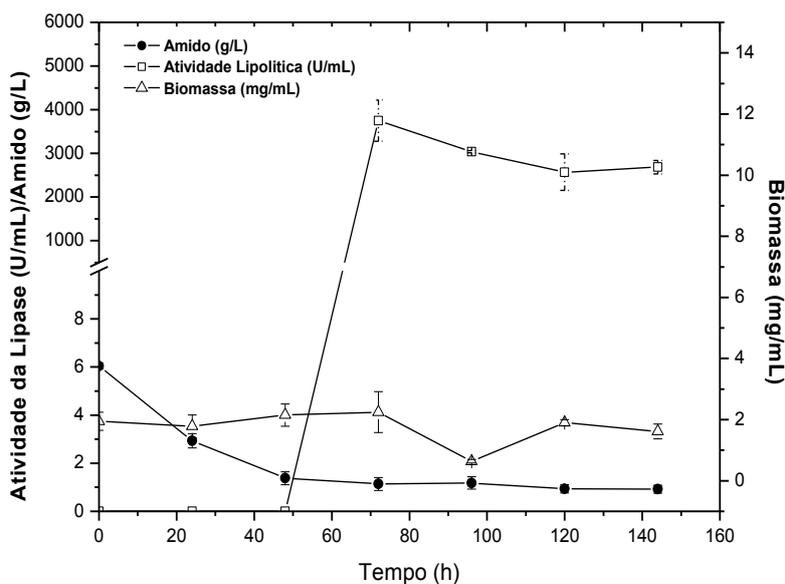
Na Figura 5.6 são apresentados os perfis cinéticos de produção de lípase na temperatura de 24°C.

Observa-se a alta produção de atividade enzimática e a manutenção desta durante e após a adição do indutor, no experimento em pH 3,0 (Ensaio 1) a máxima atividade 3891 U/mL foi atingida a 96 h de fermentação, já em pH 7,0 (Ensaio 2) o maior valor foi observado (3749 U/mL) em 24h. Sendo os resultados alcançados, superiores aos encontrado por alguns autores como TAN *et al.*(2003), que estudando a produção de lípase por *Candida sp.* em fermentação submersa, observaram que utilizando o óleo de soja como indutor a 2,5%, uma temperatura de 30°C, pH 3,0 e mesmo tempo de fermentação, obtiveram uma atividade lipolítica de 300 U/mL.

Os resultados do crescimento microbiano para pH 3,0 revelam um período de ascensão no início da fermentação, fase exponencial, chegando ao valor máximo de 5,07 mg/mL, havendo logo após a inserção do indutor um declínio, provavelmente ocasionado pela não adaptação do microrganismo a esta nova fonte de carbono.



(Ensaio 1)



(Ensaio 2)

Figura 5.6. Resultados da fermentação para a produção de enzima lipolítica à temperatura de 24°C e pH 3,0 (Ensaio 1) e pH 7,0 (Ensaio 2).

Verifica-se que a máxima atividade lipolítica alcançada apresenta-se logo após a concentração de massa celular seca entrar em fase de morte, o que pode ser explicado, de acordo com TUMANG & COSTA (2006) e BORZANI *et al.* (2005), pelo mecanismo de produção da biomassa e enzima. No início da fermentação predominam transformações produtoras de energia com formação de biomassa, a enzima só é formada quando o

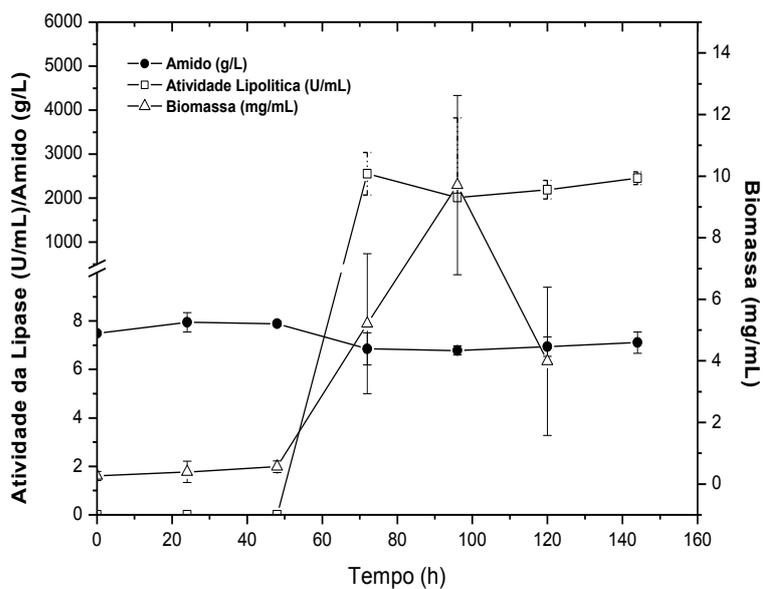
metabolismo oxidativo encontra-se atenuado. Em pH 7,0, a curva de crescimento microbiano permaneceu praticamente na fase estacionária do início até as 72 horas de fermentação, onde atingiu a concentração máxima de 2,24 mg/mL, apresentando logo após esse período o fenômeno de diauxia, este fato promoveu uma segunda fase exponencial e estacionária, caracterizando a metabolização do segundo substrato, isto é o indutor oleoso.

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

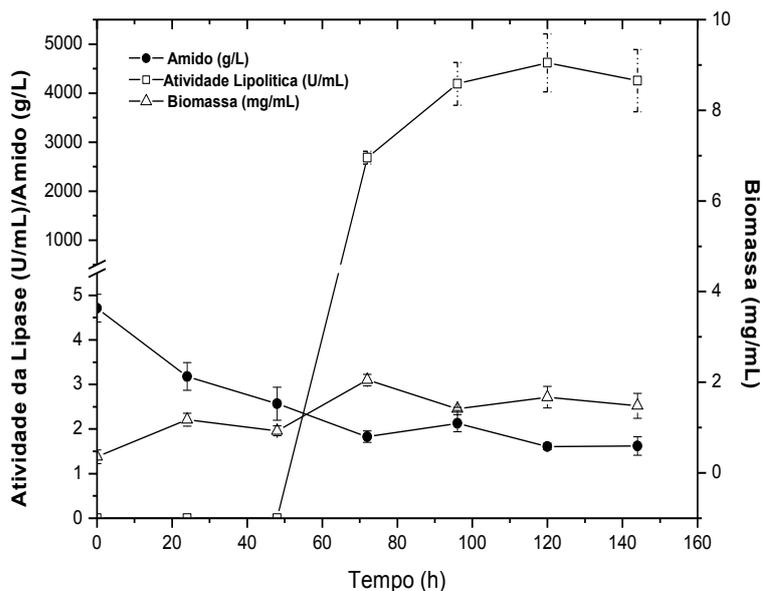
Os resultados das fermentações conduzidas a 37°C e pH 3,0 (ensaio 3) e 7,0 (ensaio 4) são apresentados na Figura 5.7. O valor máximo da atividade lipolítica, 2453 U/mL foi observado em 72 horas de fermentação em pH 3,0 e de 4617 U/mL a 120 h. BURKERT (2003), em condições similares de pH e temperatura, no seu estudo para a otimização das condições de produção da lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552, testando diferentes faixas de temperaturas (27° a 50°C) e pH (2,0 a 9,0), chegou à conclusão que temperaturas de 37°C e pH 7,0 apresentaram melhores resultados, obtendo uma atividade de 26,4 U/mL. Enquanto GULATI *et al.* (2005), utilizando uma lipase de *Fusarium globulosum* em fermentação submersa a 37°C, pH 10,0 e óleo de neem como indutor, obtiveram uma atividade lipolítica de 4,01 U/mL. Já KANWAR *et al.* (2002), alcançaram uma atividade lipolítica de 25 U/mL, utilizando como fonte de enzimas lipolíticas, em fermentação submersa a 34°C e pH 8,0, as bactérias *Pseudomonas G6*, isoladas de solo contaminado com petróleo.

O crescimento microbiano (Figura 5.7) foi mais pronunciado em pH 3,0 (10,93 mg/mL a 96 h) quando comparado com a fermentação em pH 7,0 (2,05 mg/mL a 72 h); esta observação também foi verificada quando a fermentação foi conduzida a 24°C. Segundo GINALSKA *et al.* (2007), o efeito das condições de cultura no crescimento e produção de lipase, atestaram que o crescimento microbiano é afetado principalmente pela temperatura e pelo tempo de incubação, onde foram testadas temperaturas de 30 a 40° e o período de incubação foi de seis dias, resultando numa produtividade máxima (atividade lipolítica: 150 U/mL e massa celular seca: 1.04 g/L,) em dois dias de fermentação a 30°C.

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



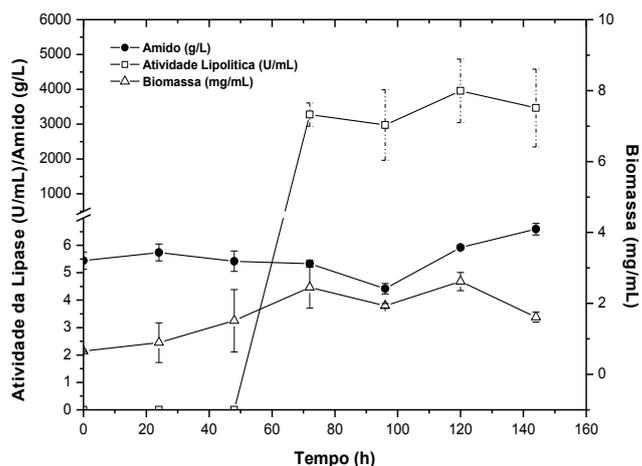
(Ensaio 3)



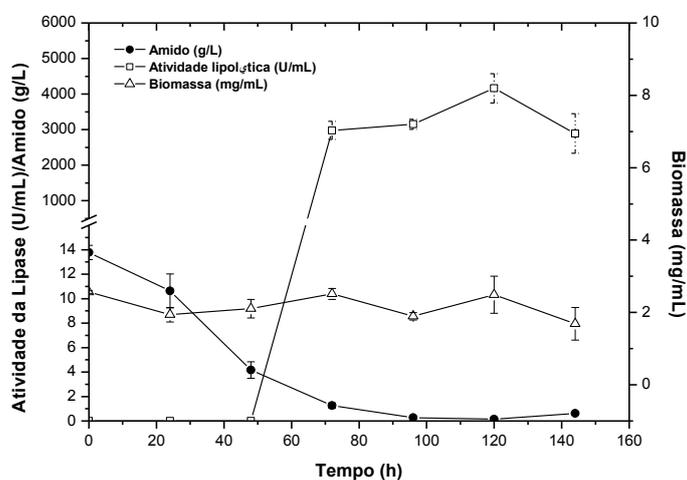
(Ensaio 4)

Figura 5.7. Resultados da fermentação para a produção de enzima lipolítica à temperatura de 37°C e pH 3,0 (Ensaio 3) e pH 7,0 (Ensaio 4).

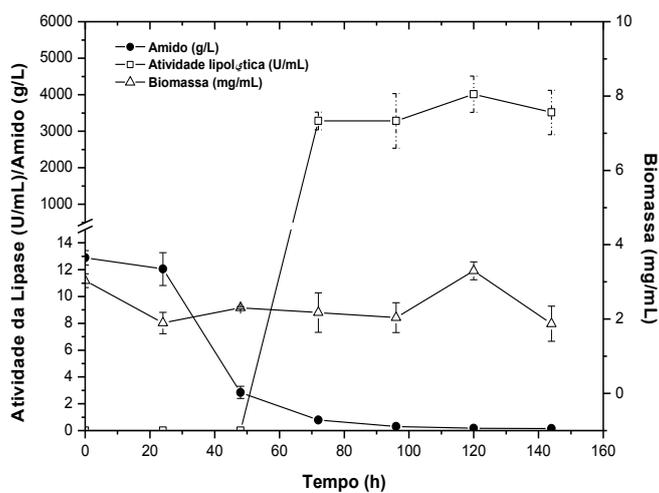
Na Figura 5.8 apresenta-se os resultados da fermentação para a produção de lipase à 30°C e pH 5,0 (Ensaios 5,6 e 7), correspondendo aos pontos centrais do planejamento de experimentos.



(Ensaio 5)



(Ensaio 6)



(Ensaio 7)

Figura 5.8. Perfil da atividade lipolítica, da biomassa e do amido, utilizando pH 5,0 e T=30°C, (Ensaio 5, 6 e 7).

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

A curva de crescimento microbiano mostra que há um estado estacionário nas fermentações com máxima produção de massa celular seca de 2,16 mg/mL, 2,88 mg/mL e 3,3 mg/mL sendo todas conseguidas a 120 h de fermentação. O consumo de amido em duas das três fermentações (Ensaio 6 e 7) foi quase que completo.

A variação do pH em todos os ensaios é apresentada na Figura 5.9, observa-se que não há grandes variações entre os valores iniciais e finais.

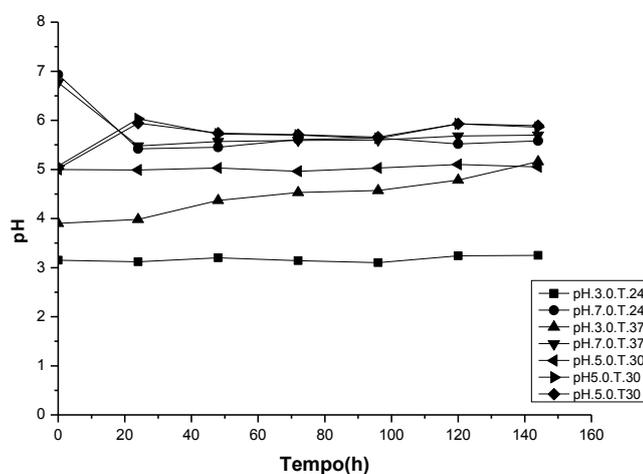


Figura 5.9. Perfil do pH com relação ao tempo.

5.2.2. Resultados do Planejamento de Experimentos

Após a seleção da melhor concentração (4%), foi adotada a metodologia do planejamento de experimentos (Tabela 5.3) para verificar os efeitos causados pelo pH e temperatura na produção das enzimas lipolíticas, para isso foi empregada uma matriz 2^2

com três pontos centrais. A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa STATISTICA (versão 5.0). Em todo o planejamento foi utilizado o mesmo meio de cultura, contendo 4% de indutor óleo de coco acrescido após 48 horas de fermentação com uma rotação de 170 rpm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A análise dos efeitos principais das variáveis estudadas e as suas respectivas interações são apresentadas na Tabela 5.4 e 5.5 e Figura 5.10. Mostra-se na Tabela 5.4, os dados da análise das estimativas de efeito, os erros padrões e o valor de p. Observa-se dentro da região analisada que o pH modelo linear (L) apresentou um erro padrão de $\pm 299,18$. Para a temperatura o erro padrão apresentado foi de $\pm 299,18$. Observando os valores de p, nota-se que o pH (X_1) e a interação entre o pH e a temperatura (X_1X_2) apresentaram influência significativa, no entanto a temperatura (X_2) não apresentou influência significativa ao nível de 95% de confiança.

Tabela 5.4. Estimativas de Efeito calculadas no estudo de avaliação da temperatura e pH ótimos para a produção de enzimas lipolíticas.

Variável Independente	Estimativa de Efeito	Erro padrão	p
Média Global	3834,40	$\pm 109,53$	0,000051*
X_1 : pH (L)	1011,00	$\pm 289,80$	0,39808*
X_2 : Temperatura	- 285,00	$\pm 289,80$	0,39791
X_1X_2	1153,00	$\pm 289,80$	0,28405*

* = Influência significativa

$R^2 = 0,90$

(L) = Modelo Linear

A validade do planejamento também foi verificada pelos resultados apresentados na Tabela 5.5 da análise de variância (ANOVA), por meio da qual se observou que o pH e a interação da temperatura com o pH apresentaram influência significativa ao nível de 95% de confiança, já que os valores de p são menores que 0,05. No entanto a temperatura não apresentou influência significativa.

A superfície de resposta e a curva de nível são apresentadas na Figura 5.10, elas apresentam a relação entre os efeitos estudados. De acordo com a superfície de resposta, pode-se afirmar que a região otimizada para a atividade lipolítica encontra-se numa faixa entre pH 5,0 e 7,0 e temperaturas na faixa entre 30°C e 37°C, obtendo-se uma atividade lipolítica máxima de 4617 U/mL a 37°C e pH 7,0 (Tabela 5.3).

Tabela 5.5. Análise de variância para o estudo de avaliação da temperatura e pH para a produção de enzimas lipolíticas.

Efeitos	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	p**
X ₁ : pH (L)	1022121,0	1	1022121,0	0,39808*
X ₂ : T	81225,0	1	81225,0	0,397912
X ₁ X ₂	1329409,0	1	1329409,0	0,028405*
Erro total	251957,0	3	89512,0	

Total (corrigido) = 2684712,0

R² = 0,90

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

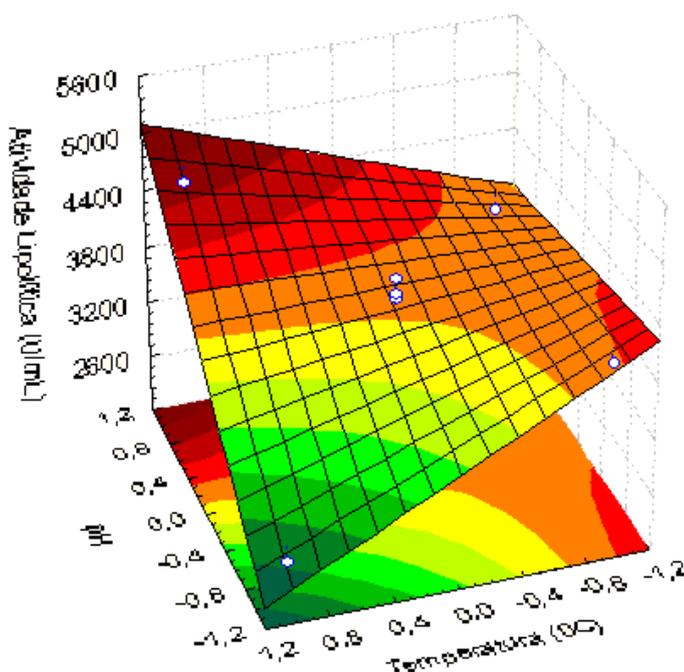


Figura 5.10. Superfície de Resposta para o estudo de avaliação da temperatura e pH ótimos para a produção de enzimas lipolíticas.

O modelo estatístico determinado para a resposta estudada foi obtido considerando os coeficientes significativos a $p < 0,05$ para o modelo com as variáveis codificadas, sendo expresso pela equação (5.1):

$$Y = 3744,4 + 505,5 X_1 + 576,5 X_1 X_2 \tag{5.1}$$

onde X₁ e X₂ representam os valores codificados para o pH e a temperatura, respectivamente.

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

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

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

Após a realização de uma análise estatística e do estudo cinético dos componentes da fermentação submersa, a partir da qual foi detectada a região otimizada para a produção máxima de enzimas lipolíticas será apresentado no seguinte capítulo o estudo comparativo de avaliação dos surfactantes Triton X-100, Tween 80 e PEG. Sendo este realizado, com o intuito de aumentar a produção de enzimas lipolíticas.

5.3. INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE SURFACTANTES AO MEIO DE CULTURA

A adição de surfactantes ao meio de cultura tem sido amplamente utilizada para aumentar a secreção das enzimas lipolíticas por diversos tipos de microrganismos, devido à ocorrência de mudanças na permeabilidade da parede celular ou ao efeito dos tensioativos sobre a célula enzimática (COSTAS *et al.*, 2004).

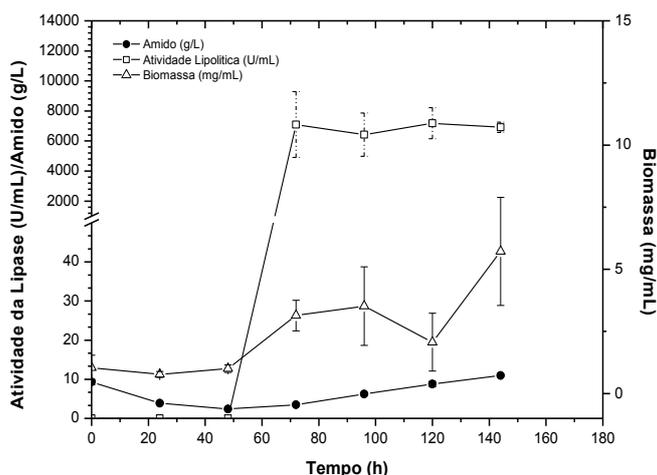
Surfactantes como Tween 80, Triton X-100 e PEG são amplamente utilizados em pesquisas para o aumento da atividade extracelular de lipases de *Thermus thermophilus* HB27 (FUCINOS *et al.*, 2005), *Candida rugosa* (HERNAIZ *et al.*, 1999), *Acinetobacter radioresistens* (LI *et al.*, 2001), *Rhizomucor miehei* (NOEL *et al.*, 2003), entre outros.

5.3.1. Perfil Cinético da Produção de Enzimas Lipolíticas na Presença de Surfactantes

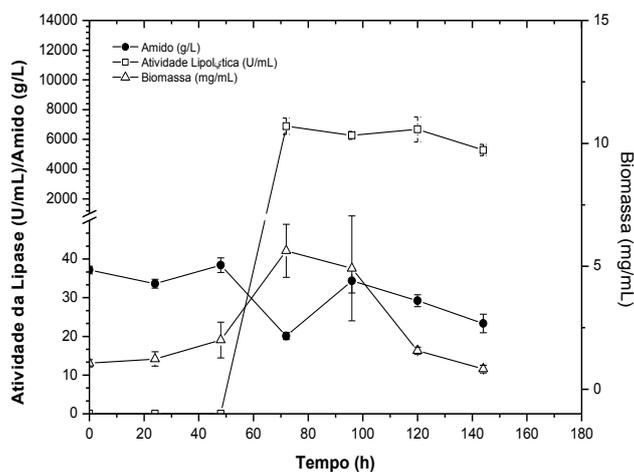
O estudo da adição de PEG 1500, Triton X-100 e Tween 80 foi realizado com o intuito de otimizar o processo de produção de enzimas lipolíticas. Em todo o estudo foi utilizado o mesmo meio de cultura, com o acréscimo de 1% de surfatante, contendo 4% de indutor óleo de coco acrescido após 48 horas de fermentação com uma rotação de 170 rpm, na temperatura de 37°C e pH 7,0. Os resultados são mostrados na Figura 5.11. e Tabela 5.6.

Observa-se por meio da Figura 5.11, que há uma tendência à manutenção da atividade lipolítica após 72h de fermentação para o experimento contendo Triton X-100 (Ensaio 1) e discreta redução para as fermentações com Tween 80 (Ensaio 2) e PEG 1500 (Ensaio 3).

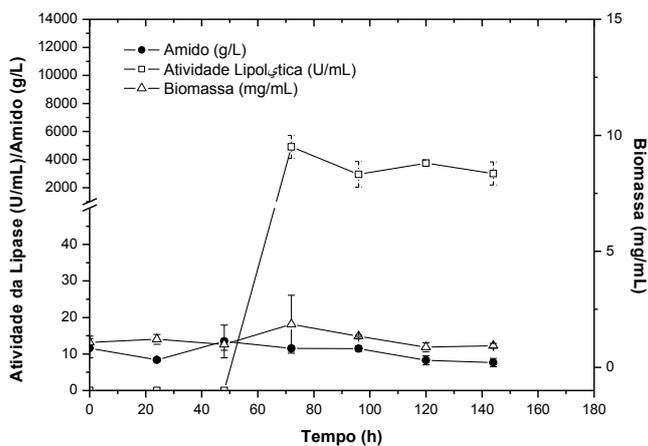
Verificou-se que o Triton X-100 foi o surfatante que apresentou a máxima atividade lipolítica com 7185 U/mL em 120 horas de fermentação. Comparativamente às fermentações na ausência de surfactantes, os valores da atividade enzimática foram 56% e 49% maior para Triton X-100 e Tween 80, respectivamente, ao passo que a adição de PEG 1500 não possibilitou um incremento na atividade da enzima. ZHANG *et al.* (2003), no seu estudo dos efeitos dos indutores para a produção de lípase por *Candida rugosa*, utilizando o Tween 85 obtiveram uma produção 70,8% maior que na ausência de surfactantes.



Triton X-100 (Ensaio 1)



Tween 80 (Ensaio 2)



PEG (Ensaio 3)

Figura 5.11. Resultados da fermentação para a obtenção de enzimas lipolíticas em presença de 1% de Triton X (Ensaio 1), Tween 80 (Ensaio 2) e PEG (Ensaio 3).

A massa celular seca aumentou com o tempo de fermentação. Em todos os experimentos foi verificada uma fase estacionária de crescimento celular até ao final da fermentação, mesmo com Triton X-100, o elevado desvio na determinação da massa celular seca não permite avaliar como oscilação o fenômeno de diauxia. BORZANI *et al.* (2005) e TUMANG & COSTA (2006), verificaram que quando a máxima atividade lipolítica ocorre logo após a fase de morte celular, é devido à predominância de transformações da geração de energia para o microrganismo e conseqüentemente geração de massa microbiana, sendo a enzima produzida na fase de morte quando o metabolismo oxidativo encontra-se atenuado, porém este fenômeno não foi observado neste estudo. As adições dos surfactantes na fermentação também proporcionaram o aumento da massa celular seca, com exceção da adição de PEG 1500, que promoveu a redução da concentração microbiana. ZHANG *et al.* (2003), no seu estudo do efeito de indutores para a produção de lípase por *Candida rugosa*, encontraram valores inferiores aos obtidos no presente estudo que foi de: 3,5 g/L⁻¹ para o Triton X-100 e 3,6 g/L⁻¹ para o Tween 80.

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

A Tabela 5.6. demonstra em termos comparativos os melhores resultados da fermentação com a presença e a ausência de surfactantes.

Tabela 5.6. Melhores resultados da fermentação com e sem adição de surfactantes para a produção de lípase a 37°C e pH 7,0.

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

5.3.2. Resultados do Planejamento de Experimentos para o Estudo da Influência de Surfactantes na Fermentação para a Produção de Enzimas Lipolíticas.

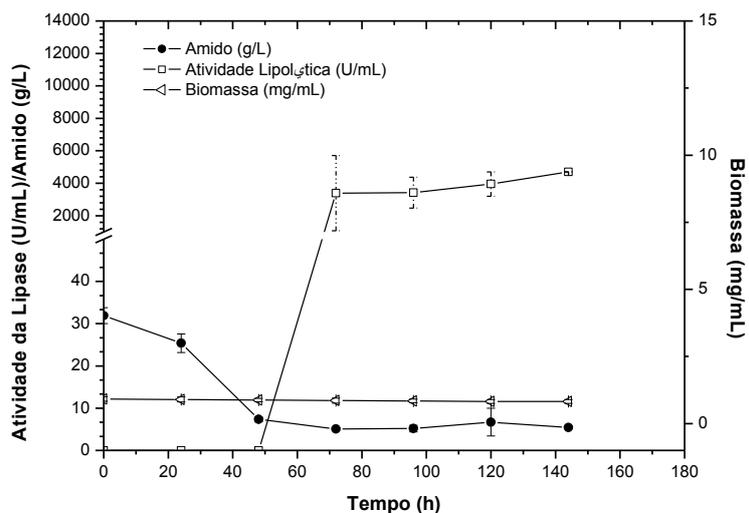
De acordo com o item anterior, chegou-se à conclusão que os surfactantes que conduziram a uma maior atividade lipolítica foram o Triton X-100 e o Tween 80. Neste caso, os valores qualitativos no planejamento de experimentos foram representados por: (-) Triton X-100 e (+) Tween 80 (Tabela 5.7).

Tabela 5.7. Planejamento de experimentos com diferentes concentrações de surfactantes.

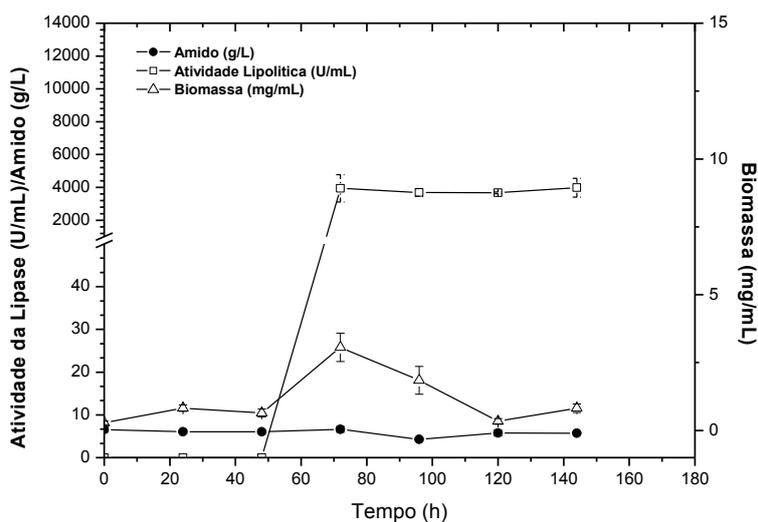
Ensaio	Níveis Codificados das Variáveis		Valores Reais das Variáveis		
	X ₁	X ₂	Surfactantes	Concentração (%)	Atividade Lipolítica (U/mL)
1	-1	-1	Triton X-100	0,2	4697
2	+1	-1	Tween 80	0,2	3982
3	-1	+1	Triton X-100	1	7185
4	+1	+1	Tween 80	1	6882
5	-1	0	Triton X-100	0,6	6266
6	+1	0	Tween 80	0,6	5592
7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

Os perfis cinéticos dos experimentos do planejamento de experimento são apresentados nas Figuras 5.12, 5.13 e 5.14.

Utilizando uma concentração de 0,2% de Triton X-100 (Figura 5.12, Ensaio 1), verifica-se que a atividade lipolítica máxima ocorreu em 144 horas de fermentação com o valor de 4697 U/mL. Enquanto LIN (1996), em seu estudo de produção por fermentação submersa de lipase alcalina de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111, em meio de cultura contendo 0,2% de Triton X-100 como surfatante e 0,2% de óleo de oliva como indutor a 30°C, obteve uma atividade máxima de 56 U/mL em 24 horas de fermentação. Em seu outro estudo LIN *et al.* (1995), observaram os efeitos do Triton X-100 para a produção de lipase alcalina por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111 em fermentação submersa, testando diferentes concentrações do surfatante Triton X-100, concluíram que com a adição de pequenas quantidades, a atividade lipolítica aumenta significativamente, atingindo a máxima atividade lipolítica de 95 U/mL, com a concentração de 0,2% do surfatante.



(Ensaio 1)



(Ensaio 2)

Figura 5.12. Resultados da fermentação para a produção de lípase utilizando 0,2% de Triton X-100. (Ensaio 1) e 0,2% de Tween 80. (Ensaio 2)

Utilizando 0,2% de Tween 80 (Figura 5.12, Ensaio 2), a atividade lipolítica máxima foi de 3982,17 U/mL em 144 horas de fermentação. No entanto LI *et al.* (2001), apresentaram valor inferior para a produção por fermentação submersa de lípase por *Acinetobacter radioresistens* utilizando 0,3% de Tween 80 como fonte de carbono, tendo obtido uma atividade lipolítica máxima de 25 U/mL em 6 horas de fermentação. Os autores fizeram a comparação empregando uma fermentação na ausência de surfactantes, com azeite de oliva como fonte de carbono, e chegaram a um valor de 2,5 U/mL. Reforçando a

hipótese de que a presença de surfactantes no meio de cultura aumenta a atividade enzimática. De acordo com DALMAU *et al.* (2000), além do Tween 80 estimular a biosíntese da lipase ele aumenta a permeabilidade celular (principalmente de leveduras), facilitando assim a exportação de diversos compostos em toda a célula através de sua membrana.

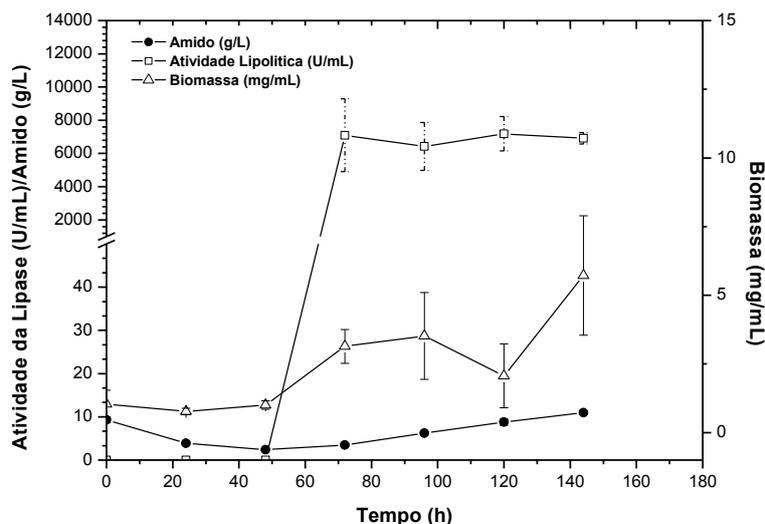
Em relação à curva de crescimento microbiano pode ser observada a existência de apenas uma fase estacionária ao longo de todo o período da fermentação, variando o mínimo da concentração microbiana na fermentação com 0,2% de Triton X e 0,2% de Tween 80. As máximas concentrações de massa celular seca foram de 0,91 mg/mL e 3,0 mg/mL para Triton X-100 e Tween 80 respectivamente (Figura 5.12).

A curva da dosagem de amido no início da fermentação apresenta-se elevada, mas logo após entra em declínio, permanecendo com a concentração praticamente constante após a inserção do indutor. Neste caso a produtividade enzimática possivelmente dependeu do consumo do indutor óleo de coco e do amido, já que não houve praticamente nenhuma alteração na curva de crescimento microbiano (Figura 5.12).

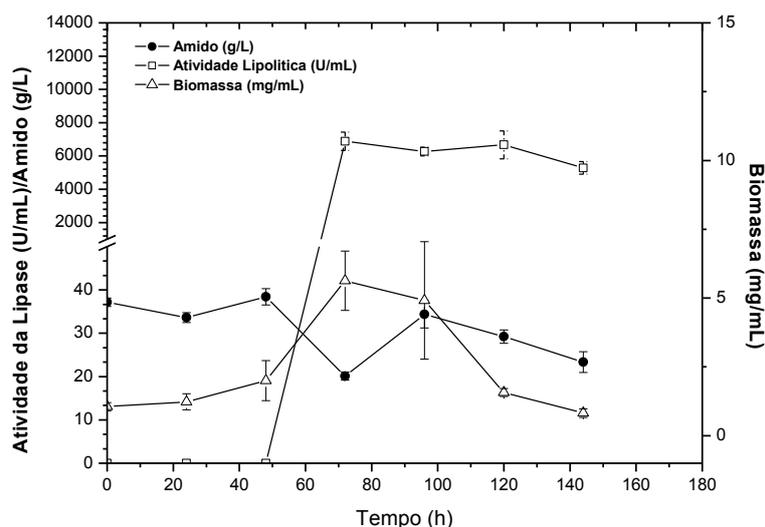
A Figura 5.13 apresenta os resultados para a fermentação com Triton X-100 (Ensaio 3) e Tween 80 (Ensaio 4) na concentração de 1%.

A máxima produção de enzima lipolítica ocorreu às 120 horas de fermentação com o valor de 7185,92 U/mL para Triton X-100, já para Tween 80 esse valor foi de 6882,78 U/mL a 72 h. BURKERT (2003), testou diferentes meios de cultura para a produção de enzimas lipolíticas em fermentação submersa, dentre eles 0,7% de Tween 80, 1% de óleo de soja como indutor à 37°C e pH 7,0, alcançando uma atividade lipolítica aproximadamente de 11 U/mL. Segundo o autor a presença do surfatante Tween 80 praticamente não influenciou na produtividade enzimática, já que na ausência do surfatante a atividade lipolítica alcançada foi semelhante àquela com surfatante. Enquanto CORZO & REVAH (1999), no seu estudo para a produção e caracterização da lipase de *Yarrowia lipolytica* 681, utilizaram como fonte de carbono 0,5 mg/mL de Tween 80, a 34°C e pH 6,0, obtendo uma atividade lipolítica de 7,4 U/mL em 48 horas de fermentação, produzindo uma biomassa equivalente a 5,4 g/L. Os pesquisadores também utilizaram nas mesmas condições o óleo de palma como indutor, não havendo detecção de atividade.

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



(Ensaio 3)

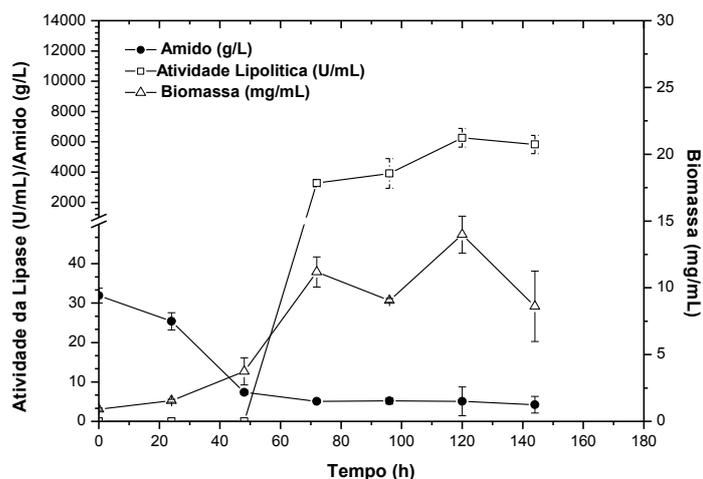


(Ensaio 4)

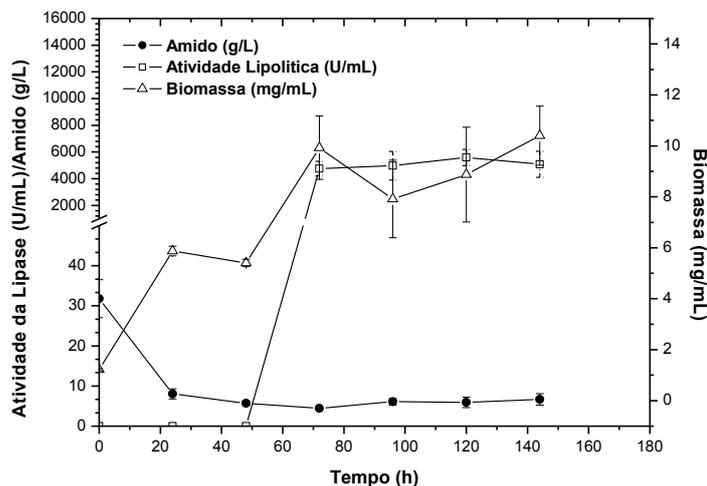
Figura 5.13. Resultados da fermentação para a produção de enzima lipolítica utilizando 1,0% de Triton X-100. (Ensaio 3) e 1,0% de Tween 80. (Ensaio 4).

A curva de crescimento microbiano, Figura 5.13, apresentou fase de adaptação extensa, ocorrendo até 48 e 24 horas para as fermentações com Triton X-100 e Tween 80. Em seguida a curva de crescimento microbiano com Tween 80 apresentou fase exponencial, estacionária e morte. A maior concentração microbiana ocorreu às 72h com Tween 80 e foi igual a 5,63 mg/mL, no mesmo tempo em que a atividade lipolítica atingiu o seu máximo.

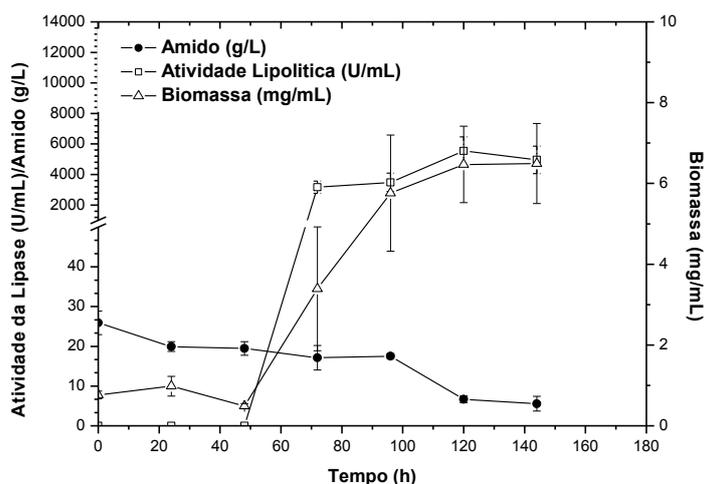
Os resultados do ponto central do planejamento de experimentos podem ser observados na Figura 5.14, para uma concentração de 0,6% dos surfactantes Tween 80 e Triton X-100. Pode-se notar uma semelhança entre os perfis da atividade lipolítica, isto é, as curvas da atividade alcançaram a máxima atividade lipolítica em 120 de horas de fermentação com os valores 6266 U/mL, 5592 U/mL, 5544 U/mL e 5698 U/mL respectivamente.



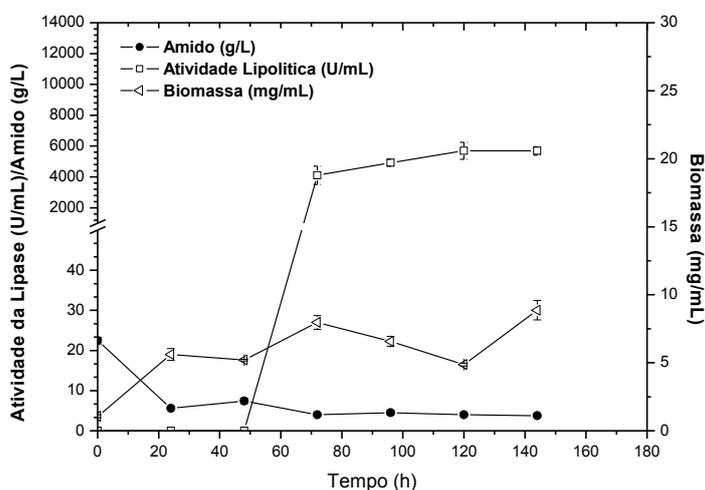
(Ensaio 5)



(Ensaio 6)



(Ensaio 7)



(Ensaio 8)

Figura 5.14. Resultados da fermentação para a produção de enzima lipolítica utilizando 0,6% de de Triton X-100. (Ensaio 5 e 7) e de Tween 80. (Ensaio 6 e 8)

O perfil da curva de dosagem de amido, Figura 5.14, é semelhante para todos os gráficos, isto é, a curva apresenta uma concentração máxima no início da fermentação, sendo que no decorrer desta há o consumo do substrato pelos microrganismos, havendo com isso um decréscimo natural da concentração de amido.

Nas curvas de crescimento microbiano, Figura 5.14, em Triton X-100 (Ensaio 5 e 7), pode-se observar a presença da fase lag prolongada (48 h) e estacionária estendendo-se até o final da fermentação. A máxima concentração foi de 13,97 mg/mL e 6,49 mg/mL em 144h de fermentação. Utilizando o Tween 80 (Ensaio 6 e 8) verifica-se inicialmente a fase exponencial em 24 e 72h, seguida da fase estacionária. As máximas concentrações de

massa celular seca foram de 10,40 mg/mL e 8,86 mg/mL em 144 horas de fermentação. Valores estes superiores aos encontrados por DALMAU *et al.* (2000), que no seu estudo dos efeitos de diferentes fontes de carbono na produção de lipase por *Candida rugosa* em fermentação submersa, utilizaram 2g/L de Tween 80 em pH 6.2 e temperatura 30°C, obtendo uma atividade de 0,4 U/mL com um crescimento celular de 0,75 g/L.

Para uma análise mais específica dos dados, foram avaliados os efeitos principais das variáveis estudadas (concentração e tipo de surfatante) e suas interações, Tabela 5.8 e 5.10 e a Figura 5.15.

Analisando a Tabela 5.8, onde estão representados os dados da análise das estimativas de efeito, os erros padrões e o valor de p, observa-se que o valor de p, para as concentrações (X_2) apresentou influência significativa ao nível de 95% de confiança. No entanto a interação entre os surfactantes e as concentrações (X_1X_2) não mostraram influência significativa. Verifica-se ainda, dentro da região analisada, que o surfatante (X_1) apresentou um erro padrão de $\pm 197,77$, para a concentração de surfactante (modelo linear - L) o erro padrão foi de $\pm 279,69$.

Tabela 5.8. Estimativas de Efeito calculadas no estudo de avaliação da concentração dos surfactantes Tween e Triton X-100.

Variável Independente	Estimativa de Efeito	Erro padrão	p
Média Global	5730,7	$\pm 98,88$	0,000001*
X_1 : Surfactante	- 384,5	$\pm 197,77$	0,123791
X_2 : Concentração (L)	2694,0	$\pm 279,69$	0,00065*
X_1X_2	206,0	$\pm 279,69$	0,502283

* = Influência significativa

$R^2 = 0,96$

(L)¹= Modelo Linear

A partir da análise de variância (ANOVA), Tabela 5.9, observou-se que o surfactante e a sua concentração foram fatores importantes, pois os valores apresentaram influência significativa ao nível de 95% de confiança, isto é os valores de p são menores que 0,05.

Tabela 5.9. Análise de variância para o estudo de avaliação da concentração dos surfactantes Tween e Triton X-100.

Efeitos	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	p**
X ₁ : Surfactante	295681,0	1	295681,0	0,123791
X ₂ : Concentração (L)	7257636,0	1	7257636,0	0,00065*
X ₁ X ₂	42436,0	1	42436,0	0,502283
Erro total	312925,0	4	78231,0	

Total (corrigido) = 79608678,0.

R² = 0,96

(L)¹ = Modelo Linear

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

Analisando a superfície de resposta, a partir dos resultados obtidos (Figura 5.15), observou-se que a região otimizada para uma máxima produção de enzimas lipolíticas encontrou-se na faixa com as concentrações mais elevadas entre 0,6% e 1% (Tabela 5.7). O modelo estatístico utilizado para a resposta estudada foi obtido considerando os coeficientes significativos a $p < 0,05$ para o modelo com as variáveis codificadas, sendo expresso pela equação (5.2):

$$Y = 5730,75 - 192,25 X_1 + 1347,0 X_2 \quad (5.2)$$

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

Observando os resultados obtidos, verifica-se que dentre os parâmetros reacionais testados, a concentração de 1% para ambos os surfactantes foi a que demonstrou maior efeito na variável resposta (atividade lipolítica), assim como o tipo do surfatante. Neste caso, os dois surfactantes analisados apresentaram resultados similares. Entretanto, a

interação entre o tipo de surfatante e a concentração não apresentou influência significativa na produção de enzimas lipolíticas.

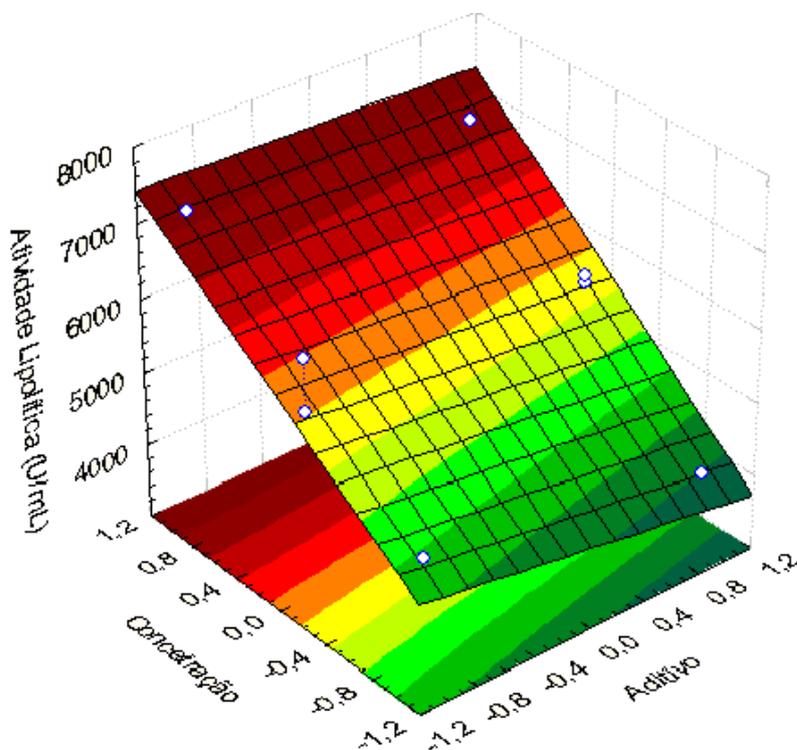


Figura 5.15. Superfície de Resposta para o estudo de avaliação da concentração dos surfactantes Tween e Triton X-100.

5.5. PRÉ-PURIFICAÇÃO

Na etapa de pré-purificação realizada após a análise das concentrações dos surfactantes Triton X-100 e Tween 80 e seus efeitos na produção de enzimas lipolíticas, no qual se chegou à melhor concentração de 1% foram adicionadas diferentes concentrações de sulfato de amônio, como pode ser observado na Tabela 5.10. Para esta etapa foram utilizados o mesmo meio de cultura descrito no item 4.2.1, contendo 1% de surfatante, 4% de indutor óleo de coco acrescido após 48 horas de fermentação com uma rotação de 170 rpm, pH 7,0 e temperatura de 37°C.

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

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

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

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

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

Tabela 5.11. Pré-Purificação enzimática do substrato fermentado utilizando Triton X-100 e Tween 80.

	Surfactantes															
	Tween 80								Triton X-100							
	Fase Aquosa				Fase Precipitada				Fase Aquosa				Fase Precipitada			
(NH ₄) ₂ SO ₄ Saturação (%)	AE (U/mL)	C _p (g/L)	AS (U/mg)	FP	AE (U/mL)	C _p (g/L)	AS (U/mg)	FP	AE (U/mL)	C _p (g/L)	AS (U/mg)	FP	AE (U/mL)	C _p (g/L)	AS (U/mg)	FP
40	91353,8	4,96	18418	1,48	80291,0	8,86	9062	0,72	100043,5	7,36	13592	2,55	2782,7	24	2782	0,52
50	97812,0	5,49	17816	1,43	64595,8	7,43	8693	0,69	105529,8	6,23	16938	3,18	2990,1	25,25	2990	0,56
60	107244,8	5,34	20083	1,61	74256,8	7,82	9495	0,76	108020,0	5,58	19358	3,63	2964,7	26,75	2964	0,55
70	134395,0	5,15	26096	2,10	77596,3	5,11	15185	1,22	101529,8	5,12	19830	3,72	716,2	19,69	716	0,13
80	125105,8	4,8	26063	2,09	74066,8	9,97	7428	0,59	106610,9	4,92	21668	4,07	1321,7	2,59	1321	0,24

AE: Atividade Enzimática
C_p: Concentração de Proteína
AS: Atividade Específica
FP: Fator de Purificação

5.6. SECAGEM DE ENZIMAS

Os resultados da temperatura do produto em relação ao tempo, parametrizados nas temperaturas da fonte de aquecimento do infravermelho (IV) são apresentados na Figura 5.16,. Verifica-se que o processo ocorreu isotérmicamente, com o material atingindo quase instantaneamente as temperaturas de 30°, 42°, 48°C.

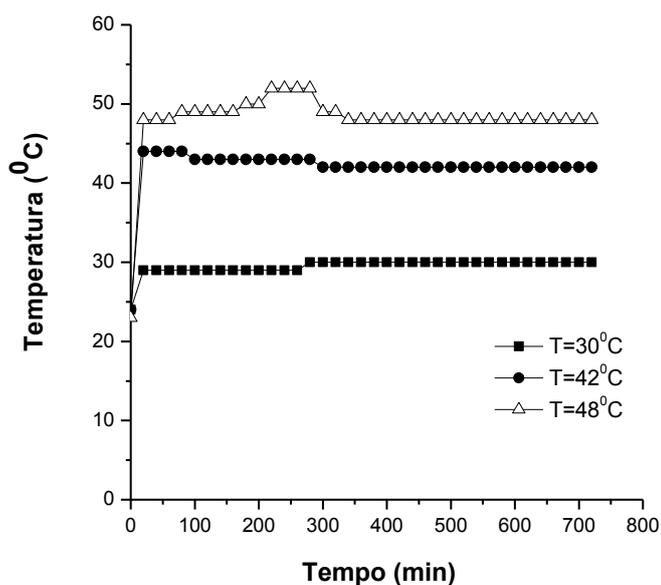


Figura 5.16. Variação da temperatura do produto durante a secagem em relação ao tempo.

Na Figura 5.17 são apresentados os resultados típicos da cinética de secagem da amostra pré-purificada exposta à radiação IV, com temperatura da fonte de 80°C. É possível constatar a proximidade das réplicas, de modo que a diferença entre os valores experimentais de umidade são inferiores aos erros de medida. Isto confirma a reprodutibilidade dos dados obtidos e, conseqüentemente, a validade da metodologia experimental empregada.

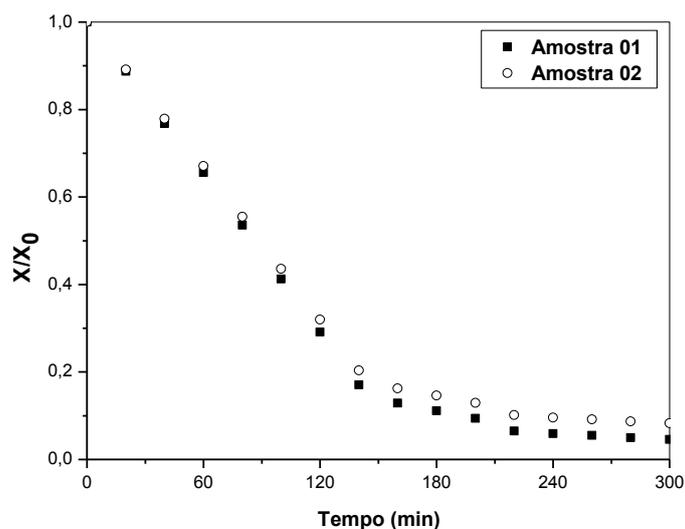


Figura 5.17. Teor de umidade adimensional em função do tempo, para a temperatura da fonte de 65°C

Na Figura 5.18 são apresentados os resultados típicos do adimensional de umidade em função do tempo, parametrizados em diferentes temperaturas da fonte de aquecimento infravermelho. Como esperado a temperatura exerce uma influência significativa sobre o comportamento da secagem do material, com um aumento nos níveis empregados, resultando em menores tempos do processo.

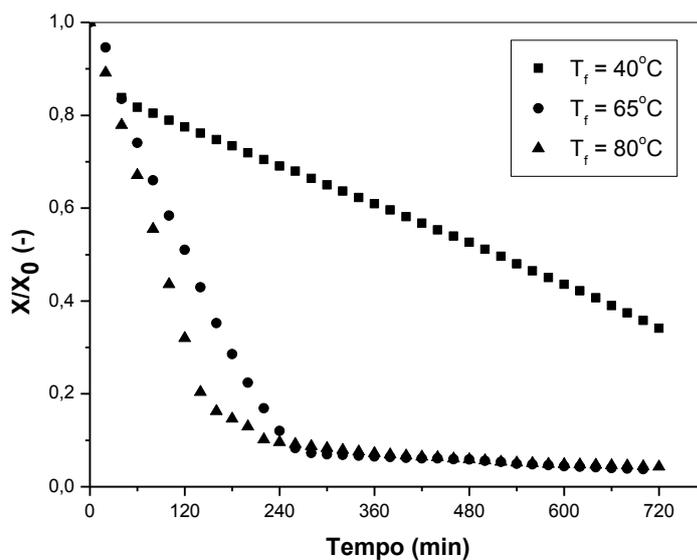


Figura 5.18: Teor de umidade adimensional em função do tempo, parametrizado nas temperaturas da fonte de aquecimento.

Com base nos resultados apresentados na Figura 5.18, pode ser constatada que a temperatura da fonte de 40°C não é recomendada para a secagem do material, pois após 12 horas de processo tem-se um elevado teor de umidade do material, em torno de 50% b.u. Assim, para se atingir um nível considerado adequado para um armazenamento seguro, um longo tempo de processo seria necessário.

A Figura 5.19 mostra a taxa de secagem em função do teor de umidade em base seca, parametrizada nas temperaturas da fonte de aquecimento IV. Verifica-se que a secagem infravermelho ocorreu nos períodos de taxa constante e decrescente, indicando que tanto as resistências externas como as internas à transferência de massa governam o processo de secagem.

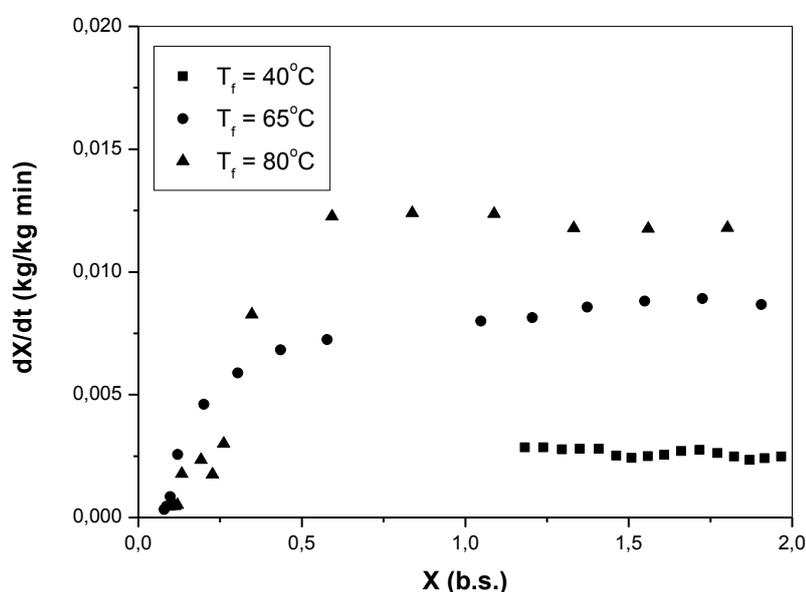


Figura 5.19. Taxa de secagem em função do teor de umidade em base seca, para diferentes temperaturas.

No início do processo, Figura 5.19, pode-se observar que a migração interna de umidade consegue suprir a taxa de evaporação na superfície, a qual é exposta à radiação eletromagnética, o que resulta no período a taxa constante. Comportamentos similares foram obtidos sob toda a faixa operacional empregada. As taxas de secagem foram maiores no início do processo, diminuindo gradualmente com a remoção de umidade. Isto porque uma maior quantidade de energia radiante é absorvida pela água localizada inicialmente na superfície da amostra, resultando em maiores taxas. Mas com a secagem da superfície da amostra, a penetração de calor através da camada seca diminui, reduzindo assim a taxa de secagem. De acordo com PRADO (2006), esta redução pode ser explicada, pelo fato de,

em condições intensas de secagem, não ocorrer uma migração de umidade interna uniforme, podendo induzir a uma impermeabilização da superfície da amostra.

A atividade específica da enzima lipolítica no início e fim dos experimentos de secagem, assim como os dados do teor de proteína, percentual de desnaturação e a atividade lipolítica são apresentadas na Tabela 5.11. Ao analisar os resultados, verifica-se que a atividade específica da enzima lipolítica aumentou após o processo, sob todas as condições operacionais empregadas. Alguns trabalhos da literatura (SAWAI *et al.*, 2003; KOHASHI *et al.*, 1996) afirmam que algumas reações enzimáticas envolvendo lipases são afetadas na faixa de temperatura de 30 a 40°C. Cabe ressaltar que, neste trabalho, tal aumento ocorreu também para temperaturas maiores que 40°C.

Tabela 5.11. Atributos da qualidade do produto em diferentes condições de secagem.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	X _{bs}	Concentração de Proteína (g/g sólido seco)	Fator de Purificação	Atividade Lipolítica (U/mL)	Atividade Específica (U/g proteína)	Percentagem de Desnaturação (%)
42	0	2,667	14,763	2,7	104155	21101	74
	12	0,099	3,744		98181	57633	
48	0	4,328	14,763	2,2	90508	26864	75
	12	0,186	3,603		90049	59276	

Este aumento significativo de atividade específica pode ser explicado com base nos valores de concentração de proteínas, que revelam uma desnaturação em torno de 75% após 12 horas de secagem IV. Com a desnaturação protéica ocorreu que o fator de purificação tornou-se duas vezes maior do que o inicial já pré-purificado.

Assim, para avaliar a viabilidade da aplicação da radiação infravermelho para a secagem da enzima lípase, foram avaliados os resultados de atividade lipolítica (U/ g sólido seco) obtidos, os quais indicam uma retenção acima de 94% da atividade lipolítica. A secagem infravermelho da enzima lípase mostrou-se, portanto promissora.

6.0. CONCLUSÃO

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

- A concentração de 4% (v/v) de óleo de coco como indutor produz a maior atividade enzimática (3455 U/mL);
- As condições de fermentação pH 7,0 e temperatura de 37°C promovem a obtenção da maior atividade lipolítica (4617 U/mL);
- A adição de surfatante no caldo a ser fermentado aumentou a atividade enzimática, quando Triton X-100 e Tween 80 foram utilizados, rendendo 7185,92 U/mL e 6882,78 U/mL, respectivamente. A adição de PEG não representou em melhora do processo de obtenção de lípase. A melhor concentração de surfatante para a obtenção da enzima é 1%, para ambos os surfactantes.
- A utilização de sulfato de amônia na pré-purificação da lípase produzida precipita as proteínas contaminantes e não a enzima. A melhor concentração de saturação é 80%, com fatores de purificação de 4,07 e 2,09 vezes, para fermentações contendo Triton X-100 e Tween 80, respectivamente.
- A aplicação da radiação infravermelho para a secagem de enzimas, mostrou-se promissora, contribuindo para a retenção da atividade lipolítica do material. Para as temperaturas de 42° e 48°C, foram obtidas elevadas atividades específicas, iguais a 57633 e 59276 U/g_{proteína}, respectivamente.

Como conclusão final, pode-se afirmar que o trabalho mostra que a produção de enzimas lipolíticas a partir do Biopetro 4 é uma alternativa promissora. No entanto, necessita de estudos complementares para a otimização do processo de produção.

7.0. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

A produção de enzimas lipolíticas demonstrou ser eficiente, utilizando fermentação submersa, no entanto, vale ressaltar algumas considerações para trabalhos futuros visando a melhorias na eficiência do processo, como por exemplo:

- 1) Estudar a pré-purificação com sistema aquoso bifásico no caldo fermentado;
- 2) Determinar os parâmetros cinéticos da enzima purificada;
- 3) Realizar novos experimentos com secagem de enzimas utilizando infravermelho em outras faixas de temperatura;
- 4) Avaliar diferentes técnicas de secagem;
- 5) Realizar futuros trabalhos, utilizando técnicas de imobilização de enzimas, utilizando-as em reações de hidrólise e de transesterificação.

8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

BECKER, P.; ABU-REESH, I.; MARKOSSIAN, S.; ANTRANIKIAN, G.; MARKE, H. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus sp.* IHI-91 o olive oil. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 48, p. 184-190, 1997.

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

BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Química**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2005.

BOSS, E. A. **Modelagem e otimização do processo de liofilização: Aplicação para leite desnatado e café solúvel**. Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas, SP. Brasil, 2004a.

BOSS, E. A.; MACIEL FILHO, R.; T.,E.C.V. Freeze drying process: real time model and optimization. *Chemical Engineering and Processing*, v. 43, p. 1475–1485, 2004b.

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

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

CARPENTER, J.F.; CROWE, J. H.; ARAKAWA, T. Comparison of Solute-Induced Protein Stabilization in Aqueous Solution and in the Frozen and Dried States. *J Dairy Sci*, v. 73, p. 3627-3636, 1990.

CARPENTER, J.F.; PRETRESLKI, S.J.; ARAKAWA, T. Separation of freezing and drying induced denaturation of lyophilized proteins using stress specific stabilization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 303, n.2, p. 456-464, 1993.

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

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

CELMA, A.R.; ROJAS, S.; RODRIGUEZ, F.L. Mathematical modelling of thin-layer infrared drying of wet olive husk. *chemical engineering and processing*, v. 47, p. 1810-1818, 2008.

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

CHUA, K.J.; MUJUMDAR, A.S.; CHOU, S.K. Intermittent drying of bioproducts—an overview. *Bioresource Technology*, v. 90, p. 285–295, 2003.

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

COSTAS, M.; DEIVE, F.J.; LONGO, M.A. Lipolytic activity in submerged cultures of *Issatchenkia orientallis*. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 2109-2114, 2004.

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

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

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

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

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

FADILUOLU, S.; ERKMEN, O. Effects of Carbon and Nitrogen Sources on Lipase Production by *Candida rugosa*. *Turkish J. Eng. Env. Sci.* v.26, 249 – 254, 2002.

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

FELLOWS, P. **Tecnología del Procesado de Los Alimentos: Principios e Prácticas.** Editorial Acribia, p. 172-177, 1994.

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

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

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

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

GINALSKA, G.; CHO, H.-Y.; CHO, N.-S.; BANCERZ, R.; KORNILOWICZ, T.; LEONOWICZ, A.; SHIN, S.-J.; OHGA, S. Effect of culture conditions on growth and lipase production by a newly isolated strain, *Geotrichum*-like R59 (Basidiomycetes). *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, v. 52, p. 29–34, 2007.

GLOUANNEC, P.; LECHARPENTIER, D.; NOEL, H. Experimental survey on the combination of radiating infrared and microwave sources for the drying of porous material. *Applied Thermal Engineering*, v. 22, p. 1689–1703, 2002.

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

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

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 64: p. 763–781, 2004.

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

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

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

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

JAYARAMAN, K. S., GUPTA, D. K. Drying of Fruits and Vegetable. In: MUJUMDAR, A. S. **Handbook of Industrial Drying**. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1995. p. 643-665. Disponível em: <http://books.google.com/books?id=uKOGg1vk61MC&printsec=frontcover&hl=pt-BR&sig=ACfU3U0lymW2aleSvsmjJipBUJCoO9A6Ag#PPP1,M1>. Arquivo capturado em 25 de junho de 2008.

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

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

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

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

KNOB, A.; TERRASAN, C.R.F.; CARMONA, E.C. Efeito das condições de cultivo e fontes de carbono na produção de xilanases por *Penicillium sclerotiorum*. CD-Rom. Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM. Paraná-PR, 2007.

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

KOHASHI, M.; AKAO, K.; WATANABE, T. Nonthermal effects of a ceramics radiation on xanthine oxidase activity. *Biosci Biotechnol Biochem*, v. 57, p. 1999–2004, 1993.

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

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

LIAO, Y-H.; BROWN, M. B.; MARTIN, G. P. Investigation of the stabilisation of freeze-dried lysozyme and the physical properties of the formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 15–24, 2004.

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

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

LIN, S-F. Production and stabilization of a solvent-tolerant alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 82, n. 5, p. 448-451, 1996.

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

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

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

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

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

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

MENDES, A.A.; CASTRO, H.F.; PEREIRA, E.B.; FURIGO JÚNIOR, A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. *Química Nova*, v.28, n.2, 296-305, 2005.

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

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

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

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

PANDEY, A.; BENJAMIN, S. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.43, n.5, Curitiba, 2000.

PASTORE, G.M.; COSTA, V.S.R.; KOBLITZ, M.G.B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *rhizopus* sp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v..23, n.2, p. 135-140, Campinas, 2003.

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

PRADO, M.M. **Recobrimento e Secagem de Sementes de Gramíneas com Cobertura Artificial a Base de Gel.** Relatório Técnico-Científico, Pós-Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2006.

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

RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de Bioprocesso para Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido utilizando Polpa Cítrica.** Dissertação de Mestrado. UFPR, PR, Brasil, 2006.

ROCHA, J.M.S. Aplicações de Agentes Tensioativos em Biotecnologia. *Boletim de Biotecnologia*, p. 5-11, DEQ, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade de Coimbra, 1999.

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

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

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

SAWAI, J.; SAGARA, K.; HASHIMOTO, A.; IGARASHI, H.; SHIMIZU, M. Inactivation characteristics shown by enzymes and bacteria treated with far-infrared radiative heating. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 38, p. 661–667, 2003.

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

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

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

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

SOARES, C.M.F.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F. de; ZANIN, G.M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Biochemistry and Biotechnology*, v. 77-79, p. 745-758, 1999.

SOCCOL, C.R. **Physiologie et Métabolisme de *Rhizopus* en Culture Solide et Submergée en Relation Avec la Dégradation d'Amidon et la Production d'Acide L(+) Lactique**. Thèse de Doctorat. Mention Génie Enzymatique, Bioconversion et Microbiologie, Université de Technologie de Compiègne. Compiègne-France, p. 218, 1992.

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

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

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

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

TSINONTIDES, S.C.; RAJNIAK, P.; PHAM, D.; HUNKE, W.A.; PLACEK, J.; REYNOLDS, S.D. Freeze drying-principles and practice for successful scale-up to manufacturing. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 280, p. 1–16, 2004.

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

USA (2008 a). **Salt Induced Precipitation of Proteins**. University of Chicago. Disponível na Internet via: <http://sosnick.uchicago.edu/precpsalt.html>. Arquivo capturado em 11 de junho de 2008.

USA (2008 b). **Protein Precipitation**. University of Chicago. Disponível na Internet via: <http://sosnick.uchicago.edu/precintro.html>. Arquivo capturado em 11 de junho de 2008.

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

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

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

9. ANEXOS

ANEXO 9.1

CURVA PADRÃO DE PROTEÍNA

A seguir apresenta-se um exemplo de obtenção da curva padrão para a determinação de proteína pelo Método de LOWRY (1951), empregando-se como padrão a ABS (albumina bovina). Na Tabela 9.1 são apresentados os dados utilizados para a obtenção da curva padrão.

Tabela 9.1. Curva de Calibração para Determinação de Proteína pelo Método de LOWRY (1951).

Tubo nº	Conc. Proteína (mg/mL)	Abs. (média)	Abs. (média)	Média (Abs)
1	0	0	0	0,000
2	0,02	0,104	0,123	0,114
3	0,04	0,251	0,273	0,262
4	0,06	0,306	0,309	0,308
5	0,08	0,386	0,392	0,389
6	0,1	0,449	0,454	0,452
7	0,12	0,525	0,511	0,518
8	0,14	0,616	0,589	0,603
9	0,16	0,657	0,646	0,652
10	0,18	0,719	0,725	0,722
11	0,2	0,774	0,738	0,756

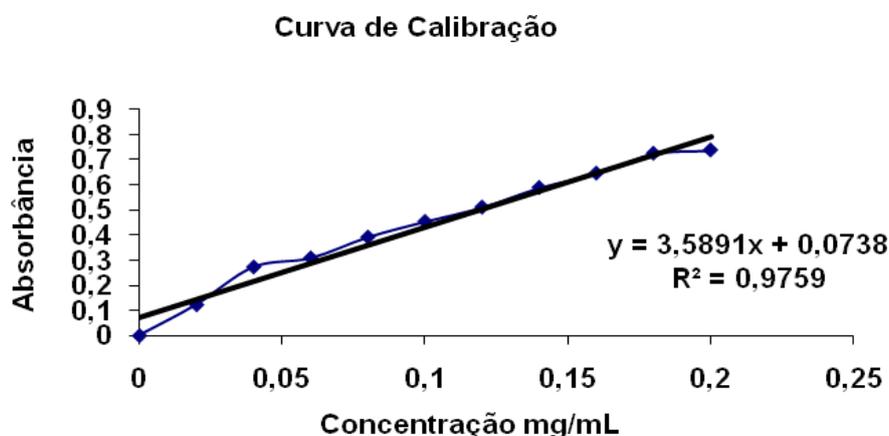


Figura 9.1. Concentração de proteína em função da absorvância

ANEXO 9.2

CURVA PADRÃO DE AMIDO

Como exemplo para a obtenção da curva padrão para a determinação do amido pelo Método de SOCCOL (1992), empregando-se como padrão o amido, têm-se a Tabela 9.2, onde são apresentados os dados utilizados para a obtenção da curva padrão.

Tabela 9.2. Curva de Calibração para Determinação do amido pelo Método de SOCCOL(1992).

Tubo n°	Conc. Amido (mg/mL)	Abs. (média)	Abs. (média)	Média (Abs)
0	0	0	0	0
1	0,1	0,181	0,199	0,192
2	0,2	0,364	0,396	0,362
3	0,3	0,562	0,563	0,553
4	0,4	0,729	0,746	0,74
5	0,5	0,956	0,947	0,908

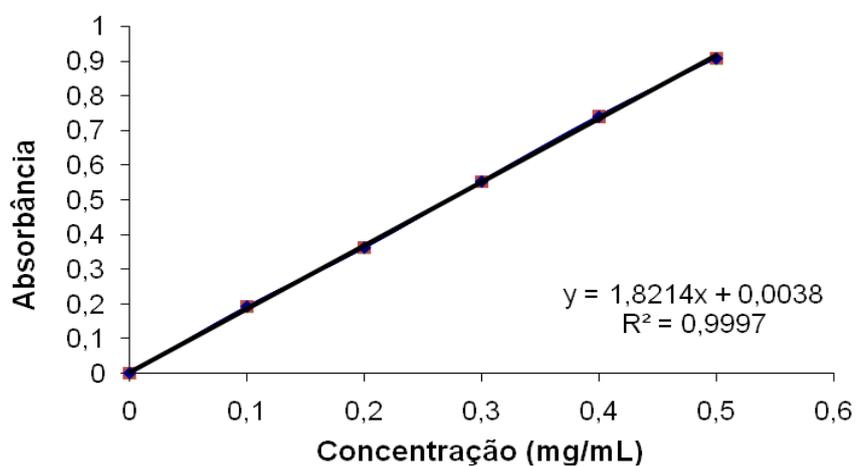


Figura 9.2. Concentração de amido em função da absorvância

ANEXO 9.3

Lista de divulgação dos resultados

Esta dissertação de mestrado foi realizada ao longo de 24 meses de estudo, durante os quais publicou-se os resultados em diferentes meios de divulgação, como a seguir listadas:

- Trabalhos completos em anais de eventos

1) FEITOSA, I. C. ; BARBOSA, J.M.P. ; ORELLANA, S. C. ; SILVA, A. L. ; SOARES, C.M.F. . Produção de lipase através de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. In: II WIMA - Workshop Internacional sobre Microbiologia Ambiental, Aracaju, 2008.

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

- Resumos em anais de eventos

1) FEITOSA, I. C.; MURATORI, I. G.; SOARES, C.M.F.; PRADO, M. M.; SILVA, A.L.; ZANIN, G.; CASTRO, H. F. Optimization of inductor concentration and fermentation conditions for lipolytic enzyme production by isolated bacterium strain from petroleum contaminated soil. In: 30th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2008, New Orleans, Louisiana. v. 1. p. 146-146, 2008.

- Apresentação de trabalhos em congressos

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

2) FEITOSA, I. C. ; SOARES, C. M. F. ; LIMA, A. S. ; PRADO, M. M. ; BARBOSA,

J.M.P. . Produção de enzimas lipolíticas através de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. WIMA, 2008.

3) BARBOSA, J.M.P. ; FEITOSA, I. C. ; LIMA, A. S. ; SOARES, C. M. F. . Otimização por planejamento experimental da produção de lipase por microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. WIMA, 2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)