



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE LIPASES E
CORRELAÇÃO COM A PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES**

Eng^a. LUCIANE MARIA COLLA

ORIENTADOR: PROF. DR. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA

RIO GRANDE, RS

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE LIPASES E
CORRELAÇÃO COM A PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES**

Eng^a. LUCIANE MARIA COLLA

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Rio Grande, como requisito para obtenção do título de Doutor.

RIO GRANDE, RS

2009

*Pai Nosso, que estás nos Céus
Na luz dos sóis infinitos
Pai de todos os aflitos
Neste mundo de escarcéus.*

*Santificado Senhor,
Seja o teu nome sublime,
Que em todo o Universo exprime
Concórdia, ternura e amor.*

*Venha ao nosso coração,
O teu reino de bondade,
De paz e de claridade
Na estrada da redenção.*

*Cumpra-se o teu mandamento
Que não vacila nem erra,
Nos Céus, como em toda a Terra
De luta e de sofrimento.*

*Evita-nos todo o mal,
Dá-nos o pão no caminho,
Feito na luz, no carinho
Do pão espiritual.*

*Perdoa-nos, meu Senhor,
Os débitos tenebrosos,
De passados escabrosos,
De iniquidade e de dor.*

*Auxilia-nos também,
Nos sentimentos cristãos,
A amar os nossos irmãos
Que vivem longe do bem.*

*Com a proteção de Jesus
Livra a nossa alma do erro,
Neste mundo de desterro,
Distante de vossa luz.*

*Que a nossa ideal igreja,
Seja o altar da Caridade,
Onde se faça a vontade
Do vosso amor...
Assim seja!*

Oração do Pai Nosso.

Aos meus filhos, Amanda e Arthur
Ao meu marido Christian
Aos meus pais, Antônio e Ana
A minha irmã Eliane

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela fé que me dá forças, pela alegria de acreditar em algo mais;

Ao meu amor, Christian, por construir esta vida comigo;

Aos meus filhos, Amanda e Arthur, pelos momentos que dediquei a este trabalho e que deixei de dar a vocês;

Aos meus pais e minha irmã, a quem recorro a qualquer momento, para a minha saúde espiritual;

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa, pela confiança e incentivo, após todos estes anos (dez!) de convívio, parceria e aprendizado;

A Telma Elita Bertolin, minha amiga, colega de sala, parceira de trabalho; pelo convívio e apoio diário;

A Flávia e ao Marcelo Hemkemeier, amigos incondicionais em todos os momentos;

As minhas orientadas de iniciação científica: Kátia Rezzadori, Andreiza Lazzarotto Primaz e Juliana Rizzardi, pela ajuda incansável no desenvolvimento da parte experimental desta tese;

A Jaqueline, minha amiga após tantos anos, que me proporcionou segurança e conforto todas as vezes que estive em Rio Grande para o desenvolver deste trabalho;

A todos que contribuíram, anônimos aos quais não saberei nomear sem cometer injustiças, que conviveram comigo, deram-me forças, auxílio, amizade.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL | 5 |
| 1.1. INTRODUÇÃO | 6 |
| 1.2. JUSTIFICATIVAS | 8 |
| 1.3. OBJETIVOS | 12 |
| 1.3.1. OBJETIVO GERAL | 12 |
| 1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 12 |
| CAPÍTULO II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 13 |
| 2.1. BIOPROCESSOS | 14 |
| 2.2. LIPASES: definições e aplicações | 19 |
| 2.2.1. INDÚSTRIA DE ALIMENTOS | 20 |
| 2.2.2. DETERGENTES | 21 |
| 2.2.3. TRATAMENTO DE EFLUENTES | 22 |
| 2.2.4. APLICAÇÃO DE LIPASES NA SÍNTESE DE ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS | 23 |
| 2.2.5. PRODUÇÃO DE BODIESEL | 24 |
| 2.3. PRODUÇÃO DE LIPASES POR MICRORGANISMOS | 25 |
| 2.3.1. EFEITO DAS FONTES DE CARBONO | 26 |
| 2.3.2. EFEITO DAS FONTES DE NITROGÊNIO | 28 |
| 2.3.3. EFEITO DOS MICRONUTRIENTES | 29 |
| 2.3.4. EFEITO DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS | 29 |
| 2.4. BIOSSURFACTANTES | 30 |
| 2.4.1. DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO | 30 |
| 2.4.2. APLICAÇÕES DOS BIOSSURFACTANTES | 31 |
| 2.4.2.1. Indústria de alimentos | 31 |
| 2.4.2.2. Biorremediação | 33 |
| 2.4.2.3. Indústria farmacêutica e de cosméticos | 34 |
| 2.4.2.4. Indústria do petróleo | 35 |
| 2.4.3. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES PELOS MICRORGANISMOS | 36 |
| 2.4.3.1. Vias metabólicas de produção de biossurfactantes | 36 |
| 2.4.3.2. Cinética da produção de biossurfactantes | 38 |
| 2.4.3.2.1. Produção associada ao crescimento | 38 |
| 2.4.3.2.2. Produção sob condições de limitação do crescimento | 38 |
| 2.4.3.2.3. Produção por células imobilizadas | 39 |
| 2.4.3.2.4. Produção com suplementação de um precursor | 39 |
| 2.4.3.3. Fatores que afetam a produção de biossurfactantes | 39 |
| 2.4.3.3.1. Fontes de macronutrientes | 39 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.3.3.2. Fatores ambientais | 42 |
| 2.5. OTIMIZAÇÃO ESTATÍSTICA DE PROCESSOS | 43 |
| 2.5.1. EXEMPLOS DE UTILIZAÇÃO DE PLANEJAMENTOS ESTATÍSTICOS | 45 |
| CAPÍTULO III: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 51 |
| CAPÍTULO IV: ARTIGOS | 60 |
| 4.1. SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE LIPASES ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO | 62 |
| 4.1.1. RESUMO | 62 |
| 4.1.2. ABSTRACT | 62 |
| 4.1.3. INTRODUÇÃO | 63 |
| 4.1.4. MATERIAL E MÉTODOS | 64 |
| 4.1.4.1. Coleta de amostras, isolamento de fungos, identificação e manutenção | 64 |
| 4.1.4.2. Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases | 64 |
| 4.1.4.3. Determinação da atividade lipolítica | 65 |
| 4.1.4.4. Análise estatística | 65 |
| 4.1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 66 |
| 4.1.5.1. Isolamento dos fungos, identificação e produção de lipases vs tempo | 66 |
| 4.1.5.2. Máximas atividades lipolíticas obtidas pelos fungos isolados do efluente de laticínios e do solo contaminado com óleo diesel | 67 |
| 4.1.6. CONCLUSÃO | 71 |
| 4.1.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 72 |
| 4.2. SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA | 75 |
| 4.2.1. RESUMO | 75 |
| 4.2.2. ABSTRACT | 75 |
| 4.2.3. INTRODUÇÃO | 75 |
| 4.2.4. MATERIAIS E MÉTODOS | 77 |
| 4.2.4.1. Microrganismos e manutenção | 77 |
| 4.2.4.2. Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases | 77 |
| 4.2.4.3. Determinação da atividade lipolítica | 77 |
| 4.2.4.4. Análise estatística | 78 |
| 4.2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 78 |
| 4.2.6. CONCLUSÃO | 82 |
| 4.2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 83 |
| 4.3. PRODUÇÃO DE LIPASES DE <i>Aspergillus</i> spp VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL | 87 |
| 4.3.1. RESUMO | 87 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 4.3.2. | ABSTRACT _____ | 87 |
| 4.3.3. | INTRODUÇÃO _____ | 88 |
| 4.3.4. | MATERIAIS E MÉTODOS _____ | 89 |
| 4.3.4.1. | Microorganismos e preparo do inóculo _____ | 89 |
| 4.3.4.2. | Meio de cultivo e condições da fermentação _____ | 89 |
| 4.3.4.3. | Determinação da atividade lipolítica _____ | 90 |
| 4.3.4.4. | Planejamento experimental _____ | 90 |
| 4.3.4.5. | Tratamento dos dados _____ | 91 |
| 4.3.5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO _____ | 91 |
| 4.3.6. | CONCLUSÃO _____ | 98 |
| 4.3.7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____ | 98 |
| 4.4. | OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA _ | 103 |
| 4.4.1. | RESUMO _____ | 103 |
| 4.4.2. | ABSTRACT _____ | 103 |
| 4.4.3. | INTRODUÇÃO _____ | 104 |
| 4.4.4. | MATERIAL E MÉTODOS _____ | 105 |
| 4.4.4.1. | Microorganismos e preparo do inóculo _____ | 105 |
| 4.4.4.2. | Meio de cultivo e aparato experimental _____ | 105 |
| 4.4.4.3. | Planejamento Experimental _____ | 106 |
| 4.4.4.4. | Determinação da atividade lipolítica _____ | 106 |
| 4.4.4.5. | Tratamento dos dados _____ | 107 |
| 4.4.5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO _____ | 107 |
| 4.4.6. | CONCLUSÃO _____ | 114 |
| 4.4.7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____ | 114 |
| 4.5. | CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LIPASE PRODUZIDA POR <i>Aspergillus sp</i> O-4 VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO _____ | 118 |
| 4.5.1. | RESUMO _____ | 118 |
| 4.5.2. | ABSTRACT _____ | 118 |
| 4.5.3. | INTRODUÇÃO _____ | 119 |
| 4.5.4. | MATERIAL E MÉTODOS _____ | 120 |
| 4.5.4.1. | Produção da enzima _____ | 120 |
| 4.5.4.2. | Extração da lipase _____ | 120 |
| 4.5.4.3. | Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática _____ | 121 |
| 4.5.4.4. | Estabilidade térmica da lipase _____ | 121 |
| 4.5.4.5. | Estabilidade ao pH _____ | 122 |
| 4.5.5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO _____ | 123 |
| 4.5.5.1. | Determinação do pH e temperatura ótimos da lipase _____ | 123 |
| 4.5.5.2. | Estabilidade Térmica _____ | 125 |

| | | |
|------------|--|-----|
| 4.5.5.3. | Estabilidade ao pH _____ | 127 |
| 4.5.6. | CONCLUSÃO _____ | 128 |
| 4.5.7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____ | 128 |
| 4.6. | CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LIPASE PRODUZIDA POR <i>Aspergillus</i> sp O-8 VIA FERMENTAÇÃO SUBMERSA _____ | 132 |
| 4.6.1. | RESUMO _____ | 132 |
| 4.6.2. | ABSTRACT _____ | 132 |
| 4.6.3. | INTRODUÇÃO _____ | 133 |
| 4.6.4. | MATERIAL E MÉTODOS _____ | 134 |
| 4.6.4.1. | Produção da enzima _____ | 134 |
| 4.6.4.2. | Efeito do pH e temperatura na atividade ótima da enzima _____ | 134 |
| 4.6.4.3. | Efeito da temperatura na estabilidade da enzima _____ | 135 |
| 4.6.4.4. | Efeito do pH na estabilidade da enzima _____ | 135 |
| 4.6.4.5. | Estabilidade ao congelamento _____ | 135 |
| 4.6.5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO _____ | 136 |
| 4.6.5.1. | Ensaio de pH e temperatura ótimos _____ | 136 |
| 4.6.5.2. | Estabilidade a temperatura _____ | 138 |
| 4.6.5.3. | Estabilidade ao congelamento _____ | 140 |
| 4.6.5.4. | Estabilidade ao pH _____ | 141 |
| 4.6.6. | CONCLUSÃO _____ | 142 |
| 4.6.7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____ | 142 |
| 4.7. | PRODUÇÃO SIMULTANEA DE LIPASES E BIOSSURFACTANTES ATRAVÉS DE FERMENTAÇÕES SUBMERSA E EM ESTADO SÓLIDO _____ | 146 |
| 4.7.1. | RESUMO _____ | 146 |
| 4.7.2. | ABSTRACT _____ | 147 |
| 4.7.3. | INTRODUÇÃO _____ | 147 |
| 4.7.4. | MATERIAL E MÉTODOS _____ | 149 |
| 4.7.4.1. | Microrganismos, manutenção e preparo do inóculo _____ | 149 |
| 4.7.4.2. | Produção de lipases e biossurfactantes via fermentação submersa _____ | 149 |
| 4.7.4.3. | Produção de lipases e biossurfactantes via fermentação em estado sólido _____ | 150 |
| 4.7.4.4. | Determinações analíticas _____ | 150 |
| 4.7.4.4.1. | Obtenção dos extratos _____ | 150 |
| 4.7.4.4.2. | Estimativa do crescimento fúngico _____ | 151 |
| 4.7.4.4.3. | Determinação da atividade lipolítica (AL) _____ | 151 |
| 4.7.4.4.4. | Determinação da atividade emulsificante _____ | 151 |
| 4.7.4.4.5. | Determinação da tensão superficial _____ | 152 |
| 4.7.4.4.6. | Determinação da atividade antimicrobiana _____ | 152 |
| 4.7.5. | RESULTADOS E DISCUSSÕES _____ | 153 |

| | | |
|--|---|------------|
| 4.7.5.1. | Produção de lipases e atividades emulsificantes em fermentação submersa e em estado sólido _____ | 153 |
| 4.7.5.2. | Correlação com a produção de lipases com as atividades emulsificantes, tensão superficial e atividade antimicrobiana dos extratos da fermentação submersa _____ | 155 |
| 4.7.6. | CONCLUSÃO _____ | 159 |
| 4.7.7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____ | 159 |
| CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO GERAL _____ | | 164 |
| APÊNDICES _____ | | 167 |
| Apêndice A - Artigo 3: Produção de lipases de <i>Aspergillus</i> spp via fermentação em estado sólido utilizando técnicas estatísticas _____ 168 | | |
| Apêndice B - Artigo 4: Otimização da produção de lipases por fermentação submersa ___ 172 | | |
| Apêndice C - Artigo 5: Caracterização parcial da lipase produzida por <i>Aspergillus</i> sp O-4 via fermentação em estado sólido _____ 176 | | |
| Apêndice D - Artigo 6: Caracterização parcial da lipase produzida por <i>Aspergillus</i> sp O-8 via fermentação submersa _____ 178 | | |
| Apêndice E - Artigo 7: Produção simultânea de lipases e biossurfactantes através de fermentação submersa e em estado sólido _____ 179 | | |
| Apêndice F - Micrografias eletrônicas dos fungos maiores produtores de lipases _____ 180 | | |
| Apêndice G - Artigo publicado: Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases através de fermentação em estado sólido _____ 181 | | |

ÍNDICE DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Tabela 1 Condições de cultivo utilizadas para a produção de surfactina pelo microrganismo *Bacillus subtilis* ATCC 21332 _____ 42
- Tabela 2 Níveis das variáveis utilizadas na otimização da produção de lipase por *A. carneus* através de um Planejamento de Face Centrada _____ 47
- Tabela 3 Coeficientes de primeira e segunda ordem e de interação para o modelo de 2ª ordem gerado na otimização da produção de fitase por *Pichia anomala* através da metodologia de superfície de resposta _____ 48
- Tabela 4 Níveis reais e codificados das variáveis utilizadas na otimização da produção de lipase por *Rhizopus arrhizus* _____ 49

ARTIGO 1: SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE LIPASES ATRAVÉS DE BIOPROCESSO EM ESTADO SÓLIDO

- Tabela 1 Análise de variância da atividade lipolítica máxima dos fungos isolados de efluente de laticínios (n = 17) e de solo contaminado com óleo diesel (n = 7) _____ 68
- Tabela 2 Atividade lipolítica máxima \pm desvio padrão (DP) dos fungos isolados de efluentes de laticínios (E) e solo contaminado com óleo diesel (O) _____ 69

ARTIGO 2: SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES VIA BIOPROCESSO SUBMERSO

- Tabela 1 Atividades lipolíticas máximas produzidas pelos fungos utilizados na fermentação submersa _____ 79
- Tabela 2 Atividades lipolíticas máximas obtidas pelos fungos utilizados na segunda etapa de seleção de fungos produtores de lipases via fermentação submersa _____ 81

ARTIGO 3: PRODUÇÃO DE LIPASES DE *Aspergillus* sp. VIA BIOPROCESSO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO TÉCNICAS ESTATÍSTICAS

- Tabela 1 Níveis codificados e reais das variáveis utilizadas no Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} e resultados de atividade lipolítica (U) obtidos em 6 dias de fermentação em estado sólido _____ 92

| | |
|---|----|
| Tabela 2 Efeitos estimados das variáveis do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3}_{IV} em função da atividade lipolítica obtida em 6 dias de fermentação em estado sólido _____ | 93 |
| Tabela 3 Níveis codificados e reais do Planejamento Fatorial Completo 2^4 e resultados de atividade lipolítica (AL) em U, obtidos em 8 dias de fermentação em estado sólido _____ | 94 |
| Tabela 4 Análise de variância dos resultados de atividade lipolítica obtidos nas condições do Planejamento Fatorial Completo 2^4 _____ | 95 |
| Tabela 5 Efeitos estimados das variáveis do Planejamento Fatorial Completo 2^4 sobre a atividade lipolítica _____ | 96 |

ARTIGO 4: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR BIOPROCESSO SUBMERSO

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 Níveis codificados e reais das variáveis utilizadas no planejamento Plackett Burman e atividades lipolíticas relativas máximas (U) obtidas nos experimentos realizados em fermentação submersa _____ | 108 |
| Tabela 2 Níveis codificados e reais do Planejamento Fatorial Completo 2^3 e resultados de Atividade Lipolítica Máxima (U) obtidos através de fermentação submersa _____ | 110 |
| Tabela 3 Valores codificados e reais das variáveis pH e concentração de extrato de levedura (CEL), utilizadas no Delineamento Composto Central Rotacional para a otimização da produção de lipases por <i>Aspergillus</i> sp (O-8) através de fermentação submersa _____ | 111 |
| Tabela 4 Análise de variância dos resultados de atividade lipolítica máxima dos experimentos do DCCR _____ | 112 |
| Tabela 5 Efeitos estimados das variáveis utilizadas no DCCR e níveis de significância _____ | 112 |

ARTIGO 5: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LIPASE PRODUZIDA POR *Aspergillus* sp (O-4) VIA BIOPROCESSO EM ESTADO SÓLIDO

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 Variáveis reais e codificadas da Matriz do Planejamento Fatorial Completo 3^2 utilizado para a verificação da influência do pH e temperatura sobre a atividade lipolítica das lipases produzidas via fermentação em estado sólido através do <i>Aspergillus</i> sp O-4 e resultados de atividade lipolítica _____ | 123 |
| Tabela 2 Análise de variância dos dados de atividade lipolítica em função do pH e temperatura, obtidos no Planejamento Fatorial Completo 3^2 _____ | 124 |
| Tabela 3 Constante de desativação térmica (k_d), coeficientes de correlação das regressões de $\ln(k)$ versus tempo e tempos de meia vida ($t_{1/2}$) das enzimas em temperaturas de 35 a 90°C _____ | 126 |

ARTIGO 6: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LIPASE PRODUZIDA POR *Aspergillus sp* (O-8) VIA BIOPROCESSO SUBMERSO

Tabela 1 Níveis reais e codificados das variáveis pH e temperatura utilizadas para a determinação da atividade lipolítica através do DCCR e resultados de atividade lipolítica (U) obtidos em cada experimento _____ 136

Tabela 2 Análise de variância dos resultados de atividade lipolítica obtidos através dos experimentos do DCCR _____ 137

Tabela 3 Efeitos estimados das variáveis sobre a atividade lipolítica nos experimentos do DCCR _____ 138

ARTIGO 7: PRODUÇÃO SIMULTANEA DE LIPASES E BIOSSURFACTANTES ATRAVÉS DE BIOPROCESSOS SUBMERSO E EM ESTADO SÓLIDO

Tabela 1 Atividade lipolítica (U), atividade emulsificante óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O) (UE) e crescimento fúngico (g/L e % proteínas) obtidos através de fermentação submersa e em estado sólido através de *Aspergillus sp* (cepas O-8 e O-4) _____ 153

Tabela 2 Tensão superficial (mN m^{-1}) dos extratos obtidos durante a fermentação submersa com o fungo *Aspergillus* O-4 _____ 157

ÍNDICE DE QUADROS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|---|----|
| Quadro 1 Comparação entre os modos de cultivo em estado sólido e submerso_____ | 18 |
| Quadro 2 Aplicações industriais de lipases _____ | 20 |
| Quadro 3 Vantagens e desvantagens dos processos químico e enzimático de produção de biodiesel _____ | 25 |
| Quadro 4 Resumo dos planejamentos experimentais utilizados na otimização do meio para a produção de equinocandina B por <i>A. nidulans</i> em fermentação submersa_____ | 46 |

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|--|----|
| Figura 1 Distribuição do mercado global de enzimas em vários setores industriais _____ | 8 |
| Figura 2 Síntese de ésteres de frutose catalizada por lipases _____ | 23 |
| Figura 3 Reação de transesterificação de óleos vegetais com álcool formando ésteres e glicerol _____ | 24 |
| Figura 4 Possibilidades de conduzir experimentos para 3 variáveis estudadas. (a) Análise de uma variável por vez, (b) matriz com todas as combinações possíveis e (c) delineamento composto central rotacional _____ | 45 |

ARTIGO 1: SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE LIPASES ATRAVÉS DE BIOPROCESSO EM ESTADO SÓLIDO

| | |
|--|----|
| Figura 1 Atividades lipolíticas em função do tempo para (a) fungos E-1, E-3, E-5 e E-6, (b) E-7 a E-10, (c) E-12 a E-15, e (d) E-16 a E-20 _____ | 66 |
| Figura 2 Atividades lipolíticas em função do tempo para (a) fungos O-1, O-3, O-4 e O-5, (b) fungos O-6, O-7 e O-8 _____ | 67 |

ARTIGO 2: SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES VIA BIOPROCESSO SUBMERSO

| | |
|---|----|
| Figura 1 Atividades lipolíticas versus tempo para os fungos (a) E-3, E-5; (b) E-16 e E-19; (c) E-20 e O-8 _____ | 80 |
|---|----|

ARTIGO 3: PRODUÇÃO DE LIPASES DE *Aspergillus* sp. VIA BIOPROCESSO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO TÉCNICAS ESTATÍSTICAS

| | |
|--|--|
| Figura 1 Superfícies de resposta da interação das variáveis F e FN ($X_1.X_2$), F e I ($X_1.X_3$), F e pH ($X_1.X_4$) e I e pH ($X_3.X_4$) sobre a atividade lipolítica obtida nos experimentos do PCC 2 ⁴ . 97 | |
|--|--|

ARTIGO 4: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR BIOPROCESSO SUBMERSO

| | |
|--|-----|
| Figura 1 Superfícies de resposta da atividade lipolítica residual máxima (AL_{RM}) em função do pH e da concentração de extrato de levedura (CEL) para a produção de lipases através de fermentação submersa segundo experimentos do PFC 2 ³ (a) e DCCR (b) _____ | 112 |
|--|-----|

ARTIGO 5: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LIPASE PRODUZIDA POR *Aspergillus* sp (O-4) VIA BIOPROCESSO EM ESTADO SÓLIDO

Figura 1 Superfície de resposta da influência da temperatura e pH sobre a atividade lipolítica _____ 124

Figura 2 Cinética de destruição térmica da enzima em temperaturas de 35 a 90°C _____ 126

Figura 3 Regressão linear das constantes de desativação térmica obtidas nas temperaturas de 35 a 90°C (ln dos dados) em função do inverso da temperatura absoluta para o cálculo da energia de desativação térmica da enzima _____ 127

Figura 4 Estabilidade ao pH das lipases produzidas pelo fungo *Aspergillus* sp (cepa O-4) via fermentação em estado sólido _____ 128

ARTIGO 6: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LIPASE PRODUZIDA POR *Aspergillus* sp (O-8) VIA BIOPROCESSO SUBMERSO

Figura 1 Superfície de resposta da influência do pH e temperatura sobre a atividade lipolítica das enzimas produzidas via fermentação submersa pelo fungo *Aspergillus* sp. a partir do DCCR _____ 138

Figura 2 Estabilidade térmica das lipases produzidas pelo fungo *Aspergillus* sp. (cepa O-8) via fermentação submersa: a) temperaturas de 40°C, 50°C, 70°C e 80°C; b) temperaturas de 70°C, 80°C e 90°C _____ 139

Figura 3 Estabilidade das lipases produzidas por *Aspergillus* sp (O-8) em fermentação submersa na estocagem sob congelamento a -20°C. _____ 141

Figura 4 Estabilidade ao pH das lipases produzidas pelo fungo *Aspergillus* sp (cepa O-8) via fermentação submersa _____ 141

ARTIGO 7: PRODUÇÃO SIMULTANEA DE LIPASES E BIOSURFACTANTES ATRAVÉS DE BIOPROCESSOS SUBMERSO E EM ESTADO SÓLIDO

Figura 1 Correlação da produção de lipases e atividades emulsificantes óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O) _____ 155

Figura 2 Absorbância versus tempo de incubação para os cultivos de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na presença dos extratos produzidos por fermentação submersa pelo fungo *Aspergillus* sp O-8 (a), e potencial antimicrobiano (%) dos extratos obtidos no tempo de 10 h de incubação do *S.aureus* (b) _____ 158

RESUMO

As lipases e os biossurfactantes são compostos produzidos por microrganismos através de fermentações em estado sólido (FES) ou submerso (FSm), os quais são aplicáveis nas indústrias alimentícia e farmacêutica, na bioenergia e na biorremediação, entre outras. O objetivo geral deste trabalho foi otimizar a produção de lipases através de fermentação em estado sólido e fermentação submersa. Os fungos foram selecionados quanto à habilidade de produção de lipases através de FES e FSm e aqueles que apresentaram as maiores atividades lipolíticas foram utilizados na seleção de variáveis significativas e na otimização da produção de lipases nos dois modos de cultivo. Foram empregadas técnicas seqüenciais de planejamento experimental, incluindo planejamentos fracionários, completos e a metodologia de superfície de resposta para a otimização da produção de lipases. As variáveis estudadas na FES foram o pH, o tipo de farelo como fonte de carbono, a fonte de nitrogênio, o indutor, a concentração da fonte de nitrogênio, a concentração do indutor e a cepa do fungo. Na FSm, além das variáveis estudadas na FES, estudaram-se as variáveis concentração inicial de inóculo e agitação. As enzimas produzidas foram caracterizadas quanto à temperatura e pH ótimos e quanto à estabilidade a temperatura e pH. Nas condições otimizadas de produção de lipases, foi avaliada a correlação entre a produção de lipases e bioemulsificantes. Inicialmente foram isolados 28 fungos. Os fungos *Aspergillus* O-4 e *Aspergillus* E-6 foram selecionados como bons produtores de lipases no processo de fermentação em estado sólido e os fungos *Penicillium* E-3, *Trichoderma* E-19 e *Aspergillus* O-8 como bons produtores de lipases através da fermentação submersa. As condições otimizadas para a produção de lipases através de fermentação em estado sólido foram obtidas utilizando-se o fungo *Aspergillus* O-4, farelo de soja, 2% de nitrato de sódio, 2% de azeite de oliva e pHs inferiores a 5, obtendo-se atividades lipolíticas máximas de 57 U. As condições otimizadas para a produção de lipases na fermentação submersa foram obtidas utilizando-se o fungo *Aspergillus* O-8, farelo de trigo, 4,5% de extrato de levedura, 2% de óleo de soja e pH 7,15. A máxima atividade obtida durante a etapa de otimização foi 6 U. As lipases obtidas por FES apresentaram atividades máximas a 35°C e pH 6,0, enquanto que as obtidas por FSm apresentaram ótimos a 37°C e pH 7,2. A estabilidade térmica das lipases produzidas via FSm foi superior a das lipases obtidas via FES, com atividades residuais de 72% e 26,8% após 1h de exposição a 90°C e 60°C, respectivamente. As lipases obtidas via FES foram mais estáveis em pH's alcalinos, com atividades residuais superiores a 60% após 24 h de exposição, enquanto as lipases produzidas via FSm foram mais estáveis em pH's ácidos, com 80% de atividade residual na faixa de pH entre 3,5 e 6,5. Na fermentação submersa a correlação entre a produção de lipases e a atividade

emulsificante óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O) dos extratos foi 95,4% e 86,8%, respectivamente, obtendo-se atividades emulsificantes máximas O/A e A/O de 2,95 UE e 42,7 UE. Embora a maior produção de lipases tenha sido obtida na fermentação em estado sólido, não houve produção concomitante de biossurfactantes. Os extratos da fermentação submersa apresentaram redução da tensão superficial de 50 mN m^{-1} para 28 mN m^{-1} e atividade antimicrobiana frente ao microrganismo *S. aureus* ATCC 25923, com potenciais antimicrobianos de 36 a 43% nos três primeiros dias de fermentação. A fermentação submersa foi a técnica que apresentou os melhores resultados de otimização da produção de lipases, bem como de produção simultânea de biossurfactantes.

PALAVRAS-CHAVE: fermentação em estado sólido, fermentação submersa, biossurfactantes, lipases.

ABSTRACT

Lipases and biosurfactantes are compounds produced by microorganisms by solid state (SSF) and submerged fermentations (SmF), being applied in food and pharmaceutical industries, in bioenergy and bioremediation, between others. The aim of this thesis was to optimize the production of lipases through solid state and submerged fermentations. The filamentous fungi were selected by the ability of production of lipases in solid-state and submerged fermentations and those that presented the highest lipolytic activities were used in the screening of significant variables and optimization of the lipases production in the both culture modes. The screening of variables and the optimization of lipase production were accomplished using sequential techniques of experimental design, including fractionary and complete designs and the response surface methodology. In solid state fermentation, the variables pH, bran, nitrogen source, inductor, concentration of the nitrogen source and inductor, and fungi were studied. In submerged fermentation beyond the variables studied in SSF, it were studied the initial inoculum concentration and agitation. The enzymes produced in the optimized conditions were characterized about its optimal temperature and pH and about its stability in front of temperature and pH. In the optimized conditions of lipase production, the correlation between lipases and bioemulsifiers production was verified. A total of 28 fungi were isolated, being selected as good producers of lipases in solid state fermentation the fungi *Aspergillus* O-4 and *Aspergillus* E-6, and as good producers of lipases in submerged fermentation the strains *Penicillium* E-3, *Trichoderma* E-19 and *Aspergillus* O-8. In solid state fermentation, optimized conditions of lipase production were obtained using the fungi *Aspergillus* O-4, soy bran, 2% of sodium nitrate, 2% of olive oil and pHs varying of 3.5 to 4.5, being obtained maximal lipolytic activities of 57 U. The optimized conditions in submerged bioprocess were obtained using the fungi *Aspergillus* (O-8), wheat bran, 4.5% of yeast extract, 2% of soy oil and pH 7.15, being the maximal activities of 6 U. The optimal activities of lipases produced in solid-state bioprocess were obtained in pH 6.0 and temperature of 35°C and for the lipases produced in submerged fermentation at 37°C and pH 7.2. Lipases produced by SmF were more stable than those produced by FES, with residual activities of 72% and 26.8% after one hour of exposition at 90°C and 60°C, respectively. Lipases obtained by FES presented higher stability in alkaline pH's, with residual activities of 60% after 24 h of exposition, while lipases obtained in SmF were more stable in acid pH's, with 80% of residual activities in pH's between 3.5 and 6.5. Lipases obtained in submerged bioprocess presented maximum activities at 37°C and pH 7.2, freezing stability at -20°C during 90 days, 80% of stability in pH of 3.5 to 6.5 and 50% of stability in pH of 7 to 10. With respect of temperature stability, the lipases maintained 72% of residual activity in

temperatures of 70 to 90°C, being these good characteristics to industrial applications. In the submerged bioprocess the correlation of lipase production and the oil/water and water/oil emulsifier activity of the extracts were 95.4 and 86.8%, respectively, obtaining maximal emulsifier activities oil/water and water/oil of 2.95 UE and 42.7 UE. In the solid-state bioprocess, besides the best productivities of lipase production were obtained, no production of biosurfactants was observed. The extracts of submerged fermentation presented reduction of superficial tension of 50 to 28 mN m⁻¹ and antimicrobial activity against the *S. aureus* ATCC 25923, with antimicrobial potentials of 36 to 43% until the third days of bioprocess. The submerged bioprocess presented the best results in the optimization of lipases production, as well as in the simultaneous production of biosurfactants. Lipases and biosurfactants produced can be applied in food and pharmaceutical industries or in cases of bioremediation.

KEY-WORDS: lipase, biosurfactants, solid state bioprocess, submerged bioprocess

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL

1.1. INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos são considerados como uma alternativa consistente para a geração de bens e serviços, o que vem ao encontro com a necessidade da implementação de tecnologias baseadas em matérias-primas renováveis e adequadas sob o ponto de vista energético e de preservação do meio ambiente.

Os bioprocessos são definidos como aqueles em que há utilização de microrganismos (fungos, bactérias) e/ou enzimas, podendo ter como objetivo a síntese de compostos químicos intracelulares (proteínas) ou extracelulares (antibióticos, álcool), a produção de biomassa (fermento de panificação, *single cell protein*), de alimentos (bebidas), de energia (biogás, etanol, biodiesel) ou ainda a degradação biológica de efluentes (degradação da matéria poluente pelos microrganismos) e a despoluição ambiental (biorremediação), sendo usados para a obtenção de produtos com diferentes valores comerciais.

As lipases (triacilglicerol-acil-hidrolases) são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis (TAG) fornecendo diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG), glicerol e ácidos graxos livres. As lipases podem catalisar reações de esterificação, interesterificação e transesterificação em meios não aquosos, acilação de mentóis e glicóis e síntese de peptídios. São aplicáveis nas indústrias de alimentos, detergentes, farmacêutica, têxtil, cosméticos e papel, na síntese enzimática de biossurfactantes, na indústria oleoquímica, na indústria de couros, podendo ser aplicáveis ainda na produção de biodiesel, em exames diagnósticos, em aplicações médicas, como biosensores, na produção de cosméticos, na resolução de misturas racêmicas, na indústria farmacêutica e de pesticidas e agroquímicos, na produção de polímeros biodegradáveis, na produção de aromas e no processamento de chás (HASAN et al., 2006; HOUDE et al., 2004; SHARMA et al., 2001).

Os biossurfactantes são compostos ativos em superfícies produzidos por microrganismos e que têm recebido crescente interesse nas últimas décadas pelas vantagens que possuem sobre os surfactantes químicos, tais como biodegradabilidade, baixa toxicidade, produção a partir de fontes renováveis, funcionalidade sob condições extremas de pH e temperatura e estabilidade (VAN DYKE et al., 1991). O potencial de aplicação dos biossurfactantes baseia-se em suas propriedades funcionais que incluem emulsificação, demulsificação, separação, solubilização e redução da tensão superficial. Essas propriedades são aplicadas na agricultura, na construção civil, em indústrias de alimentos, papel, metal, têxteis, farmacêuticas, na indústria petrolífera e em casos de biorremediação (MULLIGAN et al., 2001; BANAT et al., 2000).

As lipases e os biossurfactantes são compostos produzidos por microrganismos (bactérias, leveduras e fungos) através de fermentação submersa ou fermentação em estado sólido, com a finalidade de metabolização de substratos oleosos. Em ambos os casos, a utilização destes biocompostos apresenta inúmeras vantagens com relação à utilização de similares de origem não microbiana, no entanto, os custos de produção ainda consistem em um impeditivo a sua mais ampla utilização. Assim, o estudo de métodos de cultivo associados à seleção de novas cepas produtoras e ao estudo de meios de cultivo de baixo custo, que utilizem em especial resíduos agroindustriais, consiste em uma alternativa para a melhoria deste contexto. Da mesma forma, o uso de métodos estatísticos associados aos estudos biotecnológicos pode proporcionar a redução de custos nas etapas de pesquisa e desenvolvimento, além das vantagens relacionadas à técnica em si, da possibilidade de estudo de inúmeras variáveis que influenciam nos bioprocessos, bem como da interação entre elas.

Os fungos filamentosos, dentre os microrganismos com habilidade de produção de lipases e biossurfactantes, devido às suas características morfológicas e de metabolismo essencialmente heterotrófico, à sua resistência e sobrevivência em condições adversas, a sua diversidade de gêneros e espécies, necessitam ser mais bem estudados.

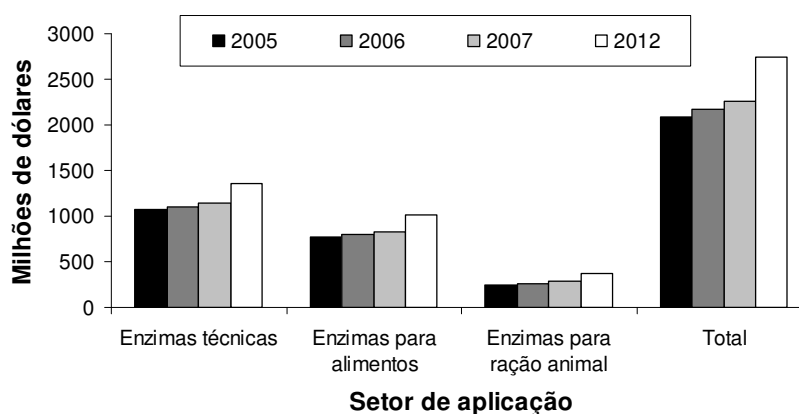
O fato de que os microrganismos, em especial os fungos filamentosos, possuam a capacidade de adaptarem-se em condições ambientais e nutricionais adversas, faz com que solos contaminados com resíduos oleosos ou efluentes industriais ricos nestes compostos, sejam uma possível fonte de fungos produtores de lipases e biossurfactantes, devido estes já encontrarem-se adaptados a estes ambientes.

As lipases e os biossurfactantes são produtos do metabolismo microbiano relacionados à metabolização de resíduos oleosos, no entanto, poucos estudos foram encontrados em que a produção de lipases e biossurfactantes tenha sido relatada concomitantemente, havendo a necessidade de melhor elucidar esta relação.

1.2. JUSTIFICATIVAS

As enzimas são catalisadores biológicos que atuam em condições brandas de reação, inversamente às condições requeridas pelos catalisadores químicos. Apresentam aplicações em diversos campos industriais, tais como na produção de polpa e papel, matérias têxteis, cosméticos e produtos químicos, na produção de alimentos, detergentes, em aplicações médicas e farmacêuticas, entre outros. As enzimas mais utilizadas são as amilases, as celulases, as lipases, as pectinases, as proteases e as xilanases.

O mercado industrial de enzimas continua crescendo devido a implementação de novas tecnologias de produção, ao uso da engenharia genética na produção e ao surgimento de novos campos de aplicação. Em 2004, houve uma demanda industrial de enzimas de 2,5 bilhões de dólares, com um crescimento anual de 5 a 10%. Mais de 90% do mercado de vendas de enzimas encontra-se nos EUA, Europa e Japão. Espera-se que o mercado global de enzimas em 2012 seja de 2,7 bilhões de dólares (IYER e ANANTHARAYAN, 2008). A distribuição do mercado de enzimas segundo suas aplicações é apresentada na Figura 1.



Fonte: IYER e ANANTHARAYAN (2008)

Figura 1 Distribuição do mercado global de enzimas em vários setores industriais

As maiores aplicações das enzimas encontram-se na medicina, na indústria têxtil, de alimentos e bebidas e recentemente para fins analíticos. As indústrias de detergentes (17%), alimentos e rações (17%), têxtil (8%) e farmacêutica (41%) são as indústrias que mais utilizam as enzimas produzidas. O uso de enzimas imobilizadas como biosensores possui potencial em análises clínicas, industriais e ambientais. Todavia, o impacto das enzimas na indústria é ainda limitado devido aos elevados custos de produção e purificação. Apesar das

vantagens do uso de enzimas, como a elevada especificidade (molecular e quiral), atividade em condições brandas e a biodegradabilidade, as desvantagens provindas da instabilidade e dificuldades de produção, processamento e estocagem, contribuem com os elevados custos (IYER e ANANTHARAYAN, 2008). Desta forma, justifica-se o estudo de processos que visem à utilização de substratos de baixo custo para a produção das enzimas, bem como a otimização da produtividade enzimática no meio de cultivo e a caracterização da enzima, a fim de que esta possa ser utilizada em condições reacionais ótimas, aumentando a conversão de substratos em produtos.

As lipases são enzimas que apresentam aplicações em diversos setores industriais, como na indústria de detergentes, alimentos, química, farmacêutica, cosméticos, papel, limpeza e couro (SHARMA et al., 2001). Na indústria alimentícia pode ser utilizada na panificação, no desenvolvimento de aromas, na produção de lipídios estruturados, na produção de bebidas, no tratamento de efluentes destas mesmas indústrias, entre outros. Apresentam ainda importante aplicação no setor de bioenergia, na produção de biocombustíveis, setor em expansão, dada à preocupação mundial com a utilização energias renováveis devido aos crescentes esforços com os cuidados ao meio ambiente.

Apesar das lipases poderem ser obtidas de fontes variáveis, como de animais, vegetais e microrganismos (COLEN, 2006), aquelas produzidas por microrganismos possuem propriedades diversificadas quanto às suas propriedades enzimáticas e especificidade pelo substrato, o que possibilita que possuam inúmeras vantagens para a aplicação em processos industriais, tais como:

- a) uma grande quantidade de lipases purificadas disponíveis;
- b) facilidade de produção em massa;
- c) maior estabilidade frente às lipases extraídas de fontes vegetais ou animais;
- d) as lipases são ativas em condições ambientais requeridas em reações a elevadas temperaturas e pressões, sendo vantajosos sob o ponto de vista industrial;
- e) Devido à especificidade enzimática, não há a formação de subprodutos indesejáveis;
- f) As lipases permanecem ativas em solventes orgânicos;
- g) Quando imobilizadas, as lipases podem ser utilizadas em reatores com temperaturas da ordem de 70 °C durante longos períodos (HASAN et al., 2006).

A produção de enzimas por microrganismos via biotecnologia pode ser realizada através de fermentação submersa ou em estado sólido. Historicamente, a produção de lipases tem sido realizada comercialmente via fermentação submersa, utilizando principalmente bactérias e leveduras. Entretanto, a produção de enzimas por fungos filamentosos pode ser melhorada através da seleção de cepas produtoras e do estudo de

meios de cultivo que otimizem a produção, sendo as técnicas estatísticas uma das formas de implementar a performance de sistemas e aumentar o rendimento destes sem o aumento dos custos. Os estudos envolvendo processos fermentativos podem ser influenciados por inúmeras variáveis, tais como as condições ambientais, de meio de cultivo e microrganismos, o que justifica o uso de técnicas seqüenciais de planejamento experimental e otimização, a fim de estudar o maior número de variáveis com menor número de experimentos, mantendo a confiabilidade estatística.

Os fungos filamentosos compõem o grupo microbiano com maior número de espécies e apresentam imensa variedade quanto à morfologia e aos atributos fisiológicos e bioquímicos. Os fungos têm sido reconhecidos como os melhores produtores de lipases e atualmente inúmeras patentes envolvendo aplicação de lipases fúngicas têm sido requeridas (COLEN, 2006).

A enorme potencialidade de aplicação de lipases, e a produção variável entre microrganismos e espécies, justificam a procura por novas linhagens produtoras, bem como a caracterização das enzimas produzidas, uma vez que o conhecimento das condições ótimas de atividade e da estabilidade da enzima é de fundamental importância para a definição das áreas de aplicação destas.

A produção mundial de surfactantes no ano 2000 alcançou de 17 a 19 Mt com expectativas de crescimento de 3 a 4% globalmente e 1,5 a 2,0% na União Européia (DELEU e PAQUOT, 2004). Embora quase todos os surfactantes utilizados sejam quimicamente derivados do petróleo, o interesse pelos biossurfactantes (surfactantes produzidos por microrganismos), tem aumentado devido às possibilidades que estes oferecem, a produção através de fermentações (KIM et al., 2000) e suas potenciais aplicações em áreas como a indústria do petróleo, a biorremediação (PAUL et al., 2007), a indústria farmacêutica (NITSCHKE e PASTORE, 2002) e de alimentos (NITSCHKE e COSTA, 2007).

Na indústria de alimentos, os biossurfactantes constituem uma alternativa à utilização de emulsificantes sintéticos, indo ao encontro à tendência mundial de substituição de aditivos sintéticos pelos naturais, visto apresentarem menor toxicidade e maior biodegradabilidade. Apesar disso, o uso em alimentos ainda é limitado, havendo a necessidade da realização de estudos que viabilizem esta aplicação.

Os biossurfactantes possuem diversas vantagens sobre os surfactantes químicos, tais como a biodegradabilidade, baixa toxicidade, produção a partir de fontes renováveis, funcionalidade sob condições extremas de pH e temperatura e estabilidade (VAN DYKE et al., 1991). Outras vantagens consistem no fato de serem produzidos utilizando substratos simples e de baixo custo, de alguns biossurfactantes não serem facilmente obtidos via síntese química e dos biossurfactantes poderem ser obtidos de acordo com a aplicação

requerida apenas pela modificação de métodos e meios de cultivo (CAMEOTRA e BOLLAG, 2003).

Entretanto, apesar das vantagens dos biossurfactantes sobre os surfactantes sintéticos, a produção dos mesmos pode custar até 50 vezes mais, dependendo do tipo e grau de pureza requerido (DELEU e PAQUOT, 2004), sendo necessário o desenvolvimento de estratégias a fim de facilitar a sua produção, tais como a redução dos custos de produção (seleção de microrganismos através da engenharia metabólica, processos de purificação), o desenvolvimento de rotas alternativas de produção (biotransformação de produtos naturais) e pela valorização de suas propriedades específicas (DELEU e PAQUOT, 2004).

As lipases e os biossurfactantes consistem em biocompostos associados ao metabolismo de resíduos oleosos pelos microrganismos. Além disso, as lipases têm sido aplicadas na síntese enzimática de ésteres de açúcares, os quais são compostos com atividade biossurfactante e emulsificante e, tanto as lipases quanto os biossurfactantes, têm sido produzidos por microrganismos via processos biotecnológicos, geralmente a partir de meios de cultivo contendo compostos lipídicos como indutores. Apesar disso, não há relatos de estudos da avaliação concomitante destes compostos durante as fermentações, justificando o estudo da correlação entre a produção de lipases e biossurfactantes.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GERAL

Otimizar a produção de lipases através de fermentação em estado sólido e fermentação submersa.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- a) Isolar fungos produtores de lipases a partir de solo contaminado com óleo diesel e efluente de laticínios;
- b) Selecionar fungos produtores de lipases via fermentação em estado sólido e fermentação submersa;
- c) Otimizar a produção de lipases através de fermentação em estado sólido e fermentação submersa;
- d) Caracterizar as lipases produzidas nos dois modos de cultivo;
- e) Nas condições otimizadas de produção de lipases, estabelecer a correlação entre a produção de lipases e biossurfactantes.

CAPÍTULO II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BIOPROCESSOS

Os bioprocessos são aqueles em que se utiliza o metabolismo de microrganismos ou parte destes, como as enzimas, para a produção de bens e serviços. Estes processos podem ser aeróbios ou anaeróbios, dependendo do microrganismo, além de poderem ser realizados em modo submerso ou em estado sólido e conduzidos de forma descontínua, descontínua alimentada, semi-contínua ou contínua.

Os bioprocessos submersos, também conhecidos como processos de fermentação submersa (FSm), consistem naqueles em que o microrganismo é introduzido em um meio líquido na forma de um inóculo, sendo o meio contido em fermentadores providos de agitação e aeração (microrganismos aeróbios) (REGULY, 2000) e outros controles, tais como: medidores de pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, entre outros. Os nutrientes encontram-se dissolvidos no meio líquido tornando-se facilmente acessíveis para utilização pelos microrganismos.

Os bioprocessos em estado sólido ou de fermentação em estado sólido (FES) são definidos como aqueles que envolvem sólidos na ausência ou quase ausência de água livre; todavia, os substratos devem possuir umidade para suportar o crescimento e metabolismo dos microrganismos. A atividade de água do meio tem sido considerada como um parâmetro fundamental para a transferência de massa de água e dos solutos através das células microbianas. O controle deste parâmetro pode ser utilizado para modificar a produção metabólica ou excreção do produto pelo microrganismo (PANDEY, 2003).

Segundo Raimbault (1998), os processos em estado sólido devem apresentar as seguintes propriedades:

- a) uma matriz sólida e porosa que pode ser biodegradável ou não e que apresente uma elevada área superficial por volume, na ordem de 10^3 a 10^6 $m^2.cm^{-3}$, para possibilitar o crescimento microbiano na interface sólido/gás;
- b) a matriz deve absorver água um ou mais vezes o seu peso seco e a atividade de água deve ser suficiente para permitir os processos bioquímicos a altas taxas;
- c) ar ou oxigênio deve fluir facilmente através da matriz;
- d) a interface sólido-gás deve ser um bom habitat para o rápido desenvolvimento de fungos, leveduras e bactérias, puros ou em culturas mistas;
- e) as propriedades mecânicas da matriz sólida deve permitir compressão ou leve agitação;

f) a matriz não deve estar contaminada por inibidores da atividade microbiana e deve ser capaz de absorver ou conter nutrientes disponíveis para a atividade microbiana, como carboidratos, fontes de nitrogênio e sais minerais.

Os principais aspectos apontados por Pandey (2003) para a condução de processos em estado sólido são o microrganismo, o substrato e os parâmetros do processo.

Os microrganismos utilizados na fermentação em estado sólido restringem-se àqueles capazes de crescer em baixas atividades de água, principalmente fungos e leveduras. Todavia, o uso de bactérias tem sido reportado em casos de compostagem, produção de inulinase a partir de *Staphylococcus* sp e ácido glutâmico a partir de *Brevibacterium* sp. As leveduras podem ser utilizadas para a produção de etanol, alimentos e ração animal (PANDEY, 2003; PANDEY et al., 2000; RAIMBAULT, 1998).

Os fungos filamentosos, entretanto, são o grupo mais importante de microrganismos na fermentação em estado sólido, devido as suas propriedades fisiológicas, enzimáticas e bioquímicas, devido:

a) o crescimento através de hifas e a sua tolerância a baixa atividade de água e elevada pressão osmótica tornam os fungos competitivos e eficientes frente a microflora natural para a bioconversão de compostos sólidos, permitindo aos mesmos penetrar nos substratos;

b) a estrutura da parede celular e o micélio ramificado formam uma estrutura firme e sólida;

c) as enzimas hidrolíticas são excretadas através das hifas, sem que haja diluição, como no caso da fermentação submersa, o que faz com que a ação das enzimas seja mais eficiente e permita maior penetração no substrato sólido;

d) os fungos não são capazes de transportar substratos macromoleculares, mas as hifas permitem um bom contato com a superfície do substrato. O micélio sintetiza e excreta grande quantidade de exoenzimas, as quais catalisam a liberação de moléculas simples que atravessam a parede celular, promovendo a biossíntese e a atividade microbiana (RAIMBAULT, 1998).

Os substratos são materiais sólidos que atuam como suporte e fonte de nutrientes, podendo ser resíduos da agroindústria, tais como: mandioca, soja, açúcar de beterraba, batatas, sorgo, farelos de trigo, arroz e milho, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos do processamento da indústria de café, bagaço de maçã, uva e abacaxi, resíduos do processamento das indústrias de óleos (canola, soja, palma), entre outros (PANDEY, 2003; PANDEY et al., 2000). Estes substratos têm em comum a sua estrutura macromolecular,

composta por amido, celulose, pectina, lignocelulose e fibras, o que muitas vezes torna necessário o preparo do substrato, que inclui:

- a) a redução de tamanho;
- b) a hidrólise físico-química ou enzimática, a fim de aumentar a disponibilidade do substrato;
- c) a suplementação de nutrientes, ajuste de pH e umidade através de uma solução mineral;
- d) o cozimento e tratamento a vapor da estrutura macromolecular para a pré-degradação e eliminação de contaminantes (RAIMBAULT, 1998).

Os parâmetros físico-químicos e bioquímicos do processo incluem o tamanho de partícula, umidade inicial, pH, pré-tratamentos do substrato, umidade, temperatura de incubação, agitação e aeração, idade do inóculo, suplementação de nutrientes como nitrogênio, fósforo e metais traço, adição de indutores e as etapas de extração e purificação do produto (PANDEY, 2003). O tamanho das partículas é de grande importância para o processo de substrato. Geralmente, partículas pequenas do substrato permitem uma maior área superficial para a atuação dos microrganismos, entretanto, partículas muito pequenas podem resultar em aglomeração do substrato interferindo na aeração e respiração microbiana (PANDEY et al., 2000).

A fermentação em estado sólido (FES) é utilizada para o cultivo de fungos sobre materiais vegetais, os quais têm seus componentes hidrolisados pela excreção de enzimas hidrolíticas pelos microrganismos. Em contraste à fermentação submersa, onde a água está em excesso, a atividade de água é o fator limitante na FES. Por outro lado, na FSm o oxigênio é o fator limitante, em contraste com a FES, onde a aeração é facilitada pela estrutura particulada e porosa da matriz, o que possibilita elevada área superficial de contato, facilitando a transferência de massa. A FES consiste em processos aeróbicos onde a respiração é fundamental. O metabolismo dos microrganismos envolvidos é exotérmico, assim, limitações muito graves podem ocorrer quando a transferência de calor não é eficiente para controlar o aumento da temperatura (RAIMBAULT, 1998).

Ainda, segundo Schmidell et al. (2001), as possíveis vantagens da fermentação em estado sólido são:

- a) apresenta uma aceleração na taxa de reação devido ao direto contato entre o substrato e o microrganismo;
- b) pode eliminar etapas de pré-tratamento do substrato;
- c) os substratos utilizados são simples, necessitando na maioria dos casos, apenas da adição de água para correção de umidade e adição de solução de micronutrientes;

- d) devido à menor quantidade de água utilizada, os reatores são menores, ocupando menores áreas, necessitando de menor investimento, reduzindo os custos com energia;
- e) nem sempre a agitação contínua é necessária;
- f) a aeração forçada ou natural é facilmente acessível aos microrganismos devido a porosidade do meio;
- g) os baixos teores de umidade aliado às elevadas concentrações iniciais de inóculo reduzem a contaminação por microrganismos indesejáveis;
- h) o produto final encontra-se concentrado, permitindo em muitos casos a utilização direta após um processo de secagem e embalagem do produto final;
- i) a recuperação do produto é facilitada devido este estar concentrado no meio fermentado, diminuindo custos com solventes na etapa de extração;
- j) menor produção de resíduos líquidos a serem tratados (SCHMIDELL et al., 2001).

Contudo, o processo apresenta algumas limitações, tais como:

- a) dependendo das características do meio e do tipo de reator empregado, pode haver dificuldade em dissipar tanto o calor produzido como os gases gerados durante o processo, o que irá conduzir para a elevação da temperatura em pontos localizados resultando em quedas no rendimento;
- b) devido à heterogeneidade do substrato, a dissipação de calor e gases gerados, manipulação do meio e do produto final e do monitoramento e controle do processo, poderá haver dificuldades intrínsecas quando se desejar realizar a ampliação de escala;
- c) se for necessário o uso de agitação, a energia despendida será maior do que na fermentação submersa;
- d) dificuldade de controle dos parâmetros do processo, como pH, temperatura, umidade, aeração e crescimento dos microrganismos;
- e) para evitar a esterilização do meio e aumentar o rendimento há necessidade de grande quantidade de inóculo;
- f) necessidade de pré-tratamento dos substratos em alguns casos;
- g) dificuldade de coleta de amostras representativas durante o processo;
- h) necessidade de controle da assepsia, quando utilizados os fungos filamentosos produtores de esporos, evitando a contaminação humana;
- i) dificuldade de ampliação de escala e existência de poucos casos de produção industrial de bioprodutos através de fermentação em estado sólido (SCHMIDELL et al., 2001).

PANDEY et al. (2000) fazem algumas comparações entre os processos em estado sólido e submersos, colocando que a grande maioria dos bioprocessos mundiais envolve o

uso da fermentação submersa, já que esta é menos problemática devido a melhor transferência de calor e homogeneidade. A fermentação em estado sólido deve ser escolhida em detrimento da fermentação submersa quando as condições econômicas a favoreçam; o produto é produzido somente através da fermentação em estado sólido ou, se produzido nos dois sistemas, o produto desta seja superior (como a exemplo da produção de biopesticidas) ou o uso de sólidos for incentivado a fim de diminuir o montante de resíduos da agroindústria.

O Quadro 1 apresenta uma comparação entre os modos de cultivo submerso e em estado sólido.

Quadro 1 Comparação entre os modos de cultivo em estado sólido e submerso

| Fator | Processos Submersos | Processos em Estado Sólido |
|---------------------------|---|--|
| Substratos | Substratos solúveis (açúcares) | Substratos insolúveis (polímeros) |
| Condições assépticas | Esterilização por calor – controle asséptico | Tratamento com vapor, condições não estéreis |
| Água | Elevados volumes de água consumida e efluentes descartados | Consumo limitado de água O volume de efluentes é menor |
| Calor metabólico | Fácil controle de temperatura | Baixa capacidade de transferência de calor |
| Aeração | Solubilidade baixa de gases no meio líquido e elevados volumes requeridos | Aeração facilitada e elevada superfície de troca ar/substrato |
| Controle de pH | Fácil | Uso de substratos sólidos tamponados |
| Agitação mecânica | Fácil homogeneização | Condições estáticas são preferidas |
| Aumento de escala | Disponibilidade de equipamentos industriais | Necessidade de desenvolvimento da engenharia e design de equipamentos |
| Inoculação | Fácil, através de processo contínuo | Inoculação por esporos, em batelada |
| Contaminação | Riscos de contaminação para os cultivos com cepas puras | Riscos de contaminação menor devido as restrições de atividade de água |
| Considerações energéticas | Elevado consumo de energia | Baixo consumo de energia |
| Volume do equipamento | Elevados volumes e altos custos tecnológicos | Pequenos volumes e baixos custos com equipamentos |
| Efluentes e poluição | Elevados volumes | Sem efluentes |

2.2. LIPASES: DEFINIÇÕES E APLICAÇÕES

As lipases são hidrolases que atuam em ligações éster do grupo carboxílico, tais como reações de esterificação, interesterificação e transesterificação em meios não aquosos, acilação de mentóis e glicóis e síntese de peptídios (CARVALHO et al., 2003; SHARMA et al., 2001).

A função fisiológica das lipases é a hidrólise dos triacilgliceróis em diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol. Em eucarióticos, as lipases estão envolvidas em vários estágios do metabolismo de lipídios, incluindo a digestão, absorção, reconstituição de gorduras e o metabolismo de lipoproteínas. Em plantas, as lipases são encontradas em tecidos de reserva de energia (SHARMA et al., 2001).

As lipases são aplicáveis em uma diversidade de setores industriais (JAEGER e EGGERT, 2002), em especial, na indústria química, na síntese de biossurfactantes (PAULA et al., 2005), na formulação de detergentes (SAISUBRAMANIAN et al., 2006) na resolução de misturas racêmicas (RAO et al., 1993), no tratamento de resíduos ricos em óleos e gorduras (LEAL et al., 2002) e na área da saúde, compondo medicamentos, em diagnósticos, cosméticos ou antibióticos (HASAN et al., 2006) e na indústria de alimentos. Recentemente, têm sido utilizadas na indústria da bioenergia, para a produção de biodiesel (PARK et al., 2006). O Quadro 2 apresenta uma série de aplicações industriais de lipases.

Quadro 2 Aplicações industriais de lipases

| Indústria | Ação | Produto ou aplicação |
|-------------------------|--|--|
| Detergentes | Hidrólise de gorduras | Remoção de óleos |
| Derivados de laticínios | Hidrólise da gordura do leite, maturação de queijos, modificações de manteigas | Desenvolvimento de agentes flavorizantes em leite, queijos e manteiga |
| Panificação | Melhorador de sabores | Prolongar a vida de prateleira |
| Bebidas | Aromas | Bebidas |
| Carnes e peixes | Desenvolvimento de sabores | Remoção de gordura, produtos de carnes e peixes |
| “Health foods” | Transesterificação | Produção de alimentos com apelo nutricional |
| Gorduras e óleos | Transesterificação, hidrólise | Manteiga de cacau, margarinas, ácidos graxos, glicerol, mono e diacilgliceróis |
| Química | Enantiosseletividade, síntese | Construção de blocos quirais |
| Farmacêutica | Transesterificação, hidrólise | Lipídios específicos, digestivos |
| Cosméticos | Síntese | Emulsificantes, umidificantes |
| Papel | Hidrólise | Melhoria da qualidade de papel |
| Limpeza | Hidrólise | Remoção de gorduras |
| Couro | Hidrólise | Produtos de couro |

Fonte: VULFSON, 1994 apud in SHARMA et al. (2001)

2.2.1. INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

As lipases, na indústria de alimentos, apresentam aplicações na síntese emulsificantes (KIM et al., 2006), na produção de lipídios estruturados com elevados teores de ácidos graxos poliinsaturados (RESHMA et al., 2008) na produção de margarinas, no desenvolvimento de aromas (SALAH et al., 2007), na maturação de queijos (DUPUIS et al., 1993) e embutidos cárneos, entre outros.

A modificação de óleos e gorduras é uma das áreas de grande crescimento na indústria de alimentos, demandando novas tecnologias. Óleos vegetais modificados estruturalmente de forma a apresentarem triacilgliceróis estruturados de importância nutricional e propriedades físico-químicas alteradas apresentam um grande potencial de mercado. Óleos baratos podem ser transformados em produtos de maior valor agregado tais

como triacilgliceróis de baixa caloria e óleos enriquecidos em ácido oléico (HASAN et al., 2006).

As lipases são utilizadas no processamento do ácido gama linolênico, astaxantina (corante alimentício), metilcetonas (moléculas características de flavor em queijos azuis), modificação de óleos vegetais na posição 2 do triacilglicerol, a fim de obter gorduras similares à gordura do leite humano para alimentação infantil, e para a produção de monoacilgliceróis para uso como emulsificante nas indústrias alimentícia e farmacêutica (SHARMA et al., 2001).

A interesterificação e a hidrogenação são técnicas que têm sido utilizadas para a preparação de gliceróis para fabricação de manteigas e margarinas. A reação de interesterificação convencional é conduzida na presença de catalisadores como o sódio, não sendo seletiva com respeito a esterificação dos ácidos graxos em uma posição respectiva no glicerol. A reação conduzida com lipases como catalisadores é muito mais específica, no entanto requer meio aquoso, o que diminui o rendimento da reação (HASAN et al., 2006).

As lipases têm sido utilizadas para a síntese de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta e álcoois, os quais são compostos voláteis responsáveis por características de odor em alimentos (HASAN et al., 2006). Por exemplo, a produção de butil acetato, o qual possui aroma de abacaxi, pode ser realizada pela reação de esterificação entre butanol e ácido acético catalizada por lipases extraídas de *Rhizopus oryzae* (SALAH et al., 2007). Similarmente, Habulin et al. (2007) citam a utilização de lipases na produção de ésteres de terpenos, os quais são utilizados como aromatizantes frutais em bebidas e alimentos.

A produção de aromas em produtos lácteos é acelerada quando há a formação de ácidos graxos livres e peptídios solúveis e aminoácidos durante a maturação do produto. As lipases têm sido utilizadas para a produção destes aromas. A hidrólise da gordura do leite promovida pelas lipases ocasiona a produção de compostos característicos de aromas em queijos, acelerando a maturação destes e possibilitando a produção de produtos similares a queijos e a lipólise da manteiga e do creme de leite. Os ácidos graxos livres gerados pela ação das lipases sobre a gordura do leite permitem o desenvolvimento de inúmeros novos produtos como os queijos leves, que apresentam características próprias de aroma, geradas pela produção de ácidos graxos de cadeia curta, os quais podem ser metabolizados por microrganismos e transformados em compostos como álcoois, cetonas, ésteres e lactonas (HASAN et al., 2006).

2.2.2. DETERGENTES

Um dos campos de maior aplicação industrial das lipases é a indústria de detergentes. O poder de limpeza dos detergentes é aumentado pela adição de enzimas em

sua composição, como amilases, proteases, celulasas e lipases (HASAN et al., 2006). Para uso em detergentes, as lipases precisam ser termoestáveis e permanecerem ativas em meios alcalinos, uma vez que precisam atuar em condições de lavagem (pH's 10 a 11 e 30 a 60°C). Além disso, devem apresentar uma baixa especificidade pelo substrato, habilidade para hidrolisar gorduras de várias composições e estabilidade a compostos das fórmulas dos detergentes, como benzeno sulfonatos e proteases (SHARMA et al., 2001).

A produção de detergentes corresponde a 32% da venda total de lipases. Estima-se que 1000 t de lipases são adicionadas a aproximadamente 13 bilhões de toneladas de detergentes produzidos anualmente (JAEGER e REETZ, 1998).

2.2.3. TRATAMENTO DE EFLUENTES

A utilização de enzimas no tratamento de despejos industriais foi proposta em 1930. Entretanto, só recentemente seu desenvolvimento como alternativa ao tratamento convencional de efluentes tem despertado grande interesse de pesquisa, em função das vantagens apresentadas, entre as quais podem ser citadas: o aumento da taxa de introdução no ambiente de poluentes orgânicos estranhos aos microrganismos e recalcitrantes, o que diminui as possibilidades de se realizar um tratamento convencional biológico ou químico que seja eficiente; há um crescente reconhecimento da capacidade das enzimas para atuar sobre poluentes específicos no tratamento; avanços recentes na biotecnologia permitiram a produção de algumas enzimas técnicas e economicamente viáveis, devido ao desenvolvimento dos procedimentos de isolamento e de purificação de microrganismos (MENDES e CASTRO, 2005).

Os efluentes industriais gerados em frigoríficos, abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral possuem elevados teores de demanda bioquímica e química de oxigênio (DBO e DQO), tendo em vista que o conteúdo de gorduras aumenta a concentração de matéria orgânica. Neste contexto, processos alternativos que visam a recuperação ou diminuição da carga de gorduras de efluentes são de interesse para a indústria. Um tratamento preliminar desses efluentes por meio da ação das lipases reduz o teor de lipídios, o diâmetro das partículas de gorduras em até 60% e o tempo de residência do efluente nas lagoas de estabilização (CASTRO et al., 2004).

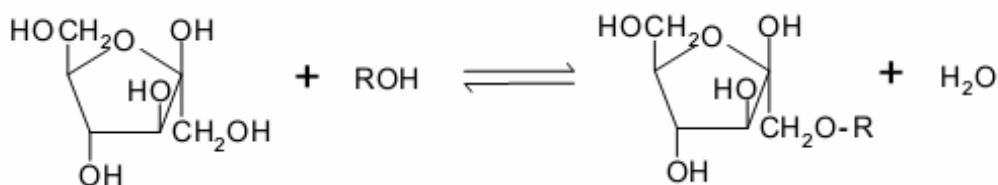
As lipases podem ser utilizadas diretamente na forma bruta (caldo fermentado) ou isoladas para promover um pré-tratamento do efluente antes da digestão anaeróbia. Entretanto, estudos têm sido realizados para verificar a possibilidade de cultivo de microrganismos produtores de lipases do gênero *Penicillium* em associação com a digestão do efluente de extração de azeite de oliva (MENDES e CASTRO, 2005).

Rosa et al. (2005) realizaram estudo a fim de empregar um preparado enzimático sólido obtido através de fermentação em estado sólido com o fungo filamentoso *Penicillium restrictum* contendo atividade lipásica de 29 U g^{-1} de torta fermentada, para o tratamento de um efluente semi-sintético contendo gordura de leite em um sistema de lodos ativados. Foram realizados experimentos controle (sem o uso do preparado enzimático) e utilizando o preparado enzimático na proporção de 0,1% (p/v). Os percentuais de gordura adicionados nos sistemas variaram de 0 (zero) a 800 mg L^{-1} de óleos e graxas e os parâmetros avaliados foram a concentração de oxigênio dissolvido, a concentração de ácidos graxos livres (indicando a ação das lipases) e a DQO. A remoção de DQO no experimento controle foi 10% menor e a velocidade de acúmulo de gordura nos flocos foi 1,7 vezes maior do que no biorreator adicionado do preparado enzimático. Quando foi adicionado 800 mg de óleos e gorduras por litro de efluente, o sistema adicionado do preparado enzimático apresentou velocidade específica de consumo de oxigênio e constante de degradação maiores do que no sistema comum, demonstrando que o pré-tratamento enzimático de efluentes pode ser uma boa alternativa em sistemas de lodo ativado operando sob regime contínuo.

2.2.4. APLICAÇÃO DE LIPASES NA SÍNTESE DE ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS

As lipases têm sido utilizadas na síntese orgânica de ésteres de ácidos graxos, os quais apresentam propriedades surfactantes, com aplicações em produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos (CARLI, 2006; PAULA et al., 2005). Produtos como triacilgliceróis, fosfolipídeos, esteróides, aromatizantes e fragrâncias, apresentam em comum uma ligação éster, apesar das diferentes propriedades físicas e diversas estruturas químicas.

Sabeder et al. (2006) utilizaram lipases na produção de ésteres de frutose, os quais se caracterizam como surfactantes não-iônicos com elevado potencial emulsificante, estabilizante e detergente. Os ésteres de açúcares apresentam-se como bons emulsificantes para aplicações em emulsões do tipo água em óleo em produtos alimentícios, além de poderem atuar como agentes antibacterianos aplicáveis como aditivos alimentares. A Figura 2 apresenta a síntese de ésteres de frutose catalizada por lipases.



Fonte: SABEDER et al. (2006)

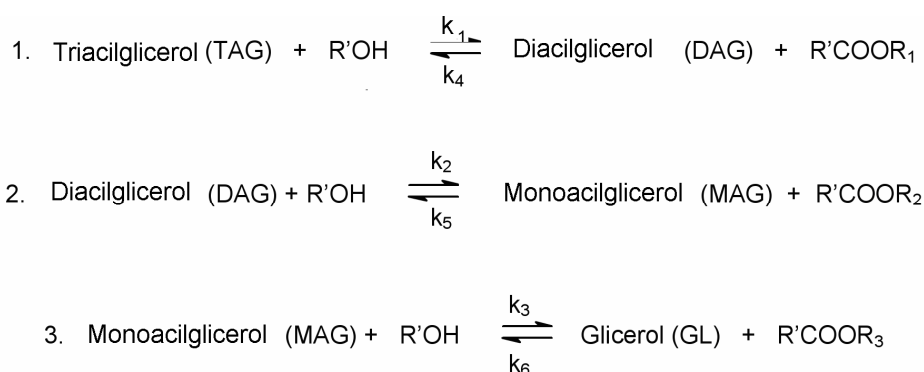
Figura 2 Síntese de ésteres de frutose catalizada por lipases

As condições ideais para a produção de glicosilmiristato utilizando lipases obtidas de *Candida antarctica* foram revisadas por Cauglia e Caneca (2008). O emprego das lipases imobilizadas em reações de esterificação e transesterificação em solventes orgânicos tem sido utilizado para a produção de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta, os quais apresentam aplicações como flavorizantes, como relatado por Salah et al. (2007), que realizaram a produção de butil acetato através da lipase produzida por *Rhizopus oryzae*. KITTIKUN et al. (2008) estudaram a produção de monoacilgliceróis a partir de oleína de palma a lipase obtida por *Pseudomonas* sp, sendo os monoacilgliceróis são os emulsificantes mais utilizados na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos.

2.2.5. PRODUÇÃO DE BODIESEL

A produção de biodiesel tem sido citada como uma das possíveis aplicações das lipases (ANTCZAK et al., 2009; DIZGE e KESKINLER, 2008; MACEDO e MACEDO, 2004). O biodiesel tem ganhado importância nos tempos atuais devido a possibilidade de substituição de combustíveis fósseis. Os problemas ambientais relacionados com a emissão de gases decorrente do uso de combustíveis fósseis têm impulsionado pesquisas no sentido de desenvolvimento de combustíveis alternativos como o biodiesel (DIZGE e KESKINLER, 2008).

O biodiesel (metil ésteres de ácidos graxos) é produzido pela transesterificação de triacilgliceróis, conforme as equações químicas mostradas na Figura 3.



Fonte: SAAD (2005)

Figura 3 Reação de transesterificação de óleos vegetais com álcool formando ésteres e glicerol

O processo de produção comercial de biodiesel é fundamentalmente realizado por via química, mas a rota enzimática tem despertado grande interesse na comunidade científica. Um aspecto comum a estes processos é a busca pela otimização das condições

de reação, de modo a lhes conferir características que os tornem viáveis e disponíveis para aplicações industriais. Entretanto, dentre algumas desvantagens essencialmente econômicas, o processo enzimático, uma vez otimizado, poderá apresentar vantagens muito interessantes em relação ao processo químico (COSTA NETO, 2002), como demonstrado no Quadro 3.

Quadro 3 Vantagens e desvantagens dos processos químico e enzimático de produção de biodiesel

| Processos | Vantagens | Desvantagens |
|------------------|--|---|
| Químico | Simplicidade Alto rendimento Curto tempo de reação | Dificuldade de separação do catalisador Impossibilidade de reutilização do catalisador Dificuldade de utilização de etanol hidratado Obtenção de produtos com menor grau de pureza |
| Enzimático | Facilidade de separação do catalisador Obtenção de produtos mais puros Permite o uso de etanol hidratado na reação | Longo tempo de reação Custo das enzimas |

Fonte: SAAD (2005)

2.3. PRODUÇÃO DE LIPASES POR MICRORGANISMOS

As lipases microbianas são produzidas principalmente em cultivos submersos (SHARMA et al., 2001), embora muitos autores mencionem os processos em estado sólido como uma alternativa viável para a produção de enzimas microbianas devido à simplicidade e economia do processo (HAQ et al., 2002). As células imobilizadas têm sido utilizadas em alguns casos. Muitos estudos têm sido realizados a fim de definir as condições ótimas e os requerimentos nutricionais para a produção de lipases (SHARMA et al., 2001).

A produção de lipases pode ser influenciada pelo tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio, pH do meio, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido no caso da fermentação submersa (SHARMA et al., 2001).

2.3.1. EFEITO DAS FONTES DE CARBONO

As fontes de carbono comumente mencionadas em trabalhos de produção de lipases microbianas são azeites de oliva e palma, Tween 20 e 40, trioleína e tripalmitina, frutose, óleos de soja, girassol, algodão e milho. As fontes lipídicas de carbono parecem essenciais para a obtenção de elevados rendimentos, todavia, alguns autores têm produzido lipases na ausência de óleos e graxas com bons rendimentos (SHARMA et al., 2001). Dalmau et al. (2000) reportaram que a produção de lipases por espécies de *Candida* é inibida na presença de açúcares simples.

O azeite de oliva foi utilizado para a produção de lipases por células livres e imobilizadas de *Aspergillus niger* no estudo realizado por Ellaiah et al. (2004). Foram testadas concentrações de 0 (zero) a 1,25% de azeite de oliva, sendo as maiores atividades enzimáticas ($U L^{-1}$) obtidas na concentração de 1% da fonte de carbono, tanto pelas células livres como pelas imobilizadas. Já D'Annibale et al. (2005) estudaram a utilização de efluentes do processo de extração de azeite de oliva como substratos para a produção de lipases. Foram testados vários microrganismos, dentre os quais *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *Candida cylindracea*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium citinum*, *Rhizopus arrhizus* e *Rhizopus oryzae*. O microrganismo que apresentou os melhores resultados foi *C. cylindracea* NRRL Y-17506, o qual foi estudado como modelo. A produção de lipases foi afetada pela adição de fontes de carbono suplementares como o azeite de oliva e os óleos de soja e milho, na concentração de $3,0 g L^{-1}$. A adição do azeite de oliva aumentou a atividade enzimática de 1,24 para $9,0 UI mL^{-1}$, enquanto a adição dos óleos de milho e soja resultou em atividades de 6,42 e $6,34 UI mL^{-1}$, respectivamente.

As fontes de carbono simples como glicose, galactose, frutose, xilose, sacarose, glicerol, sorbitol e manitol foram utilizadas por Lin et al. (2005) para a produção lipases por *Antrodia cinnamomea*, um basidiomiceto, em processos submersos. Os melhores resultados foram atingidos com os álcoois, de $26,69 mU mL^{-1}$ para o glicerol, $10,70 mU mL^{-1}$ para o sorbitol e $8,25 mU mL^{-1}$ para o manitol.

Haq et al. (2002) estudaram a produção de lipases por fungos através de fermentação em estado sólido. Os microrganismos testados foram *Rhizopus oryzae*, *Mucor lipolytica*, *Rhizopus oligosporous*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*, *Rhizopus nigrican*, *Rhizopus arrhizum* e *Aspergillus wentii*. Dentre estes, o *R. oligosporous* apresentou a máxima atividade lipolítica nos testes preliminares, de $30 U g^{-1}$. Como substratos para a produção de lipases foram testadas as farinhas de amêndoa, côco, mostarda e soja, a casca de arroz e o farelo de trigo. Os melhores resultados foram obtidos com a farinha de amêndoas, devido apresentar os maiores percentuais de óleos dentre as

fontes de carbono estudadas, bem como por ser boa fonte de proteínas, carboidratos e cinzas.

O óleo de gergelim foi utilizado na concentração de 0,5% como fonte de carbono para a produção de lipases pelo microrganismo *Fusarium solani* em fermentação submersa, tendo apresentado o melhor resultado de atividade enzimática (0,88 ou 0,45 U mg⁻¹ de proteína) dentre os óleos testados (trioleína, côco, milho, palma e oliva). O óleo de gergelim, embora tenha levado aos melhores resultados em atividade enzimática, apresentou as menores quantidades de proteína extracelular (o que indica maior atividade por unidade de proteína) e as menores concentrações de biomassa, o que seria uma vantagem comercial da produção (SHARMA et al., 2001).

A síntese de enzimas por fermentação em estado sólido é realizada utilizando-se, principalmente, resíduos agroindustriais, tais como farelo de trigo, sabugo de milho, casca de manga, torta de babaçu, farelo de amendoim, dentre outros. Estes resíduos podem, em alguns casos, apresentar tanto a função de suporte para crescimento do microrganismo, como fonte de carbono e/ou indutor para a síntese enzimática. O resíduo pode ser também utilizado apenas como suporte do crescimento dos fungos (DAMASO et al., 2005). Com o intuito de investigar o efeito do uso do farelo de trigo e do sabugo de milho como suporte para a produção de lipase por *Aspergillus niger*, Damaso et al. (2005) realizaram a adição do azeite de oliva em diferentes concentrações, tendo a função de fonte de carbono e indutor da síntese de lipases. O melhor resultado foi obtido com farelo de trigo como suporte e 2% de azeite de oliva (10,7 U mL⁻¹). Os autores ainda testaram a possibilidade de substituição do azeite de oliva por resíduos da indústria do óleo de milho. O farelo de trigo foi mantido como suporte e os resíduos foram adicionados ao meio na concentração de 4%, sendo eles a borra, a estearina e ácidos graxos. Verificou-se que os subprodutos do refino do óleo de milho podem ser utilizados como fonte de carbono e indutores do processo de síntese de lipases. As melhores atividades foram obtidas com a borra e a estearina, de 13,8 U mL⁻¹ e 8,3 U mL⁻¹. O uso do ácido graxo inibiu significativamente a síntese de lipases, provavelmente por ser o produto da hidrólise de fontes lipídicas, fenômeno que ocorre quando a síntese da enzima se dá pelo processo de indução/repressão.

Cordova et al. (1998) estudaram a produção de lipases em FES utilizando bagaço de cana-de-açúcar e torta de oliva (um resíduo do processo de extração de azeite de oliva) como substratos. A torta de oliva e o bagaço de cana apresentaram efeito sinérgico na produção de lipases, demonstrando que substratos de baixo custo, considerados resíduos, podem ser utilizados para este fim.

2.3.2. EFEITO DAS FONTES DE NITROGÊNIO

As fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas podem ser utilizadas para a produção de lipases. As fontes orgânicas podem ser a peptona, água de maceração de milho, farinha de soja, aminoácidos, triptona, extrato de levedura e uréia. As fontes inorgânicas como os sais de amônio (sulfatos, fosfatos, cloretos), nitratos e nitritos podem ser utilizados, embora os melhores rendimentos em lipases tenham sido obtidos através de fontes orgânicas de nitrogênio, tais como peptona, extrato de levedura e torta de soja. O sulfato de amônio apresentou resultados negativos em alguns trabalhos. Entretanto, a produção de lipases foi incrementada quando o sulfato de amônio foi associado a fontes de nitrogênio orgânicas (SHARMA et al. 2001).

Fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas foram utilizadas para a produção de lipases em fermentação submersa por um basidiomiceto. As fontes comparadas foram adicionadas ao meio na concentração de 0,5%, sendo elas: triptona, peptona, caseína, glicina, prolina, glutamina, asparagina, cloreto de amônio, sulfato de amônio, oxalato de amônio, acetato de amônio, nitratos de sódio e potássio e nitrito de sódio. Os melhores resultados foram obtidos com os aminoácidos asparagina ($6,41 \text{ mU mL}^{-1}$), glicina ($5,36 \text{ mU mL}^{-1}$) e glutamina ($4,74 \text{ mU mL}^{-1}$) e com a triptona ($4,77 \text{ mU mL}^{-1}$) (LIN et al., 2006).

Há casos em que a fonte de nitrogênio utilizada no meio de cultivo influencia os níveis de adição da fonte de carbono, o que foi demonstrado por Falony et al. (2005), os quais otimizaram um meio de cultivo para a produção de lipases via FES pelo fungo *Aspergillus niger*. O farelo de trigo foi utilizado como suporte para o crescimento do fungo, a glicose como fonte de carbono, o azeite de oliva como indutor da produção de lipase e como fontes de nitrogênio o sulfato de amônio e a uréia. A fim de otimizar o meio de cultivo para a síntese enzimática foram realizados três Planejamentos Experimentais do tipo Box-Behnken, sendo as variáveis experimentais a concentração de glicose, a umidade do meio de cultivo e a concentração de azeite de oliva. O primeiro conjunto de experimentos foi realizado utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, o segundo com uréia e o terceiro com uma mistura das duas fontes, de forma que o nitrogênio fosse fornecido em iguais quantidades pelas duas fontes. O primeiro planejamento apresentou como variáveis significativas a umidade e o azeite de oliva, sendo a máxima atividade enzimática obtida de $7,44 \text{ U g}^{-1}$ nas condições de 2,81% de glicose, 65% de umidade e 4,5% de azeite de oliva. Com a utilização da uréia como fonte de nitrogênio, as três variáveis resultaram significativas, sendo a máxima atividade enzimática obtida de $7,76 \text{ U g}^{-1}$ nas condições de 1,5% de glicose, 65% de umidade e 1,5% de azeite de oliva. Quando uréia e sulfato de amônio foram utilizadas simultaneamente como fontes de nitrogênio, somente a umidade resultou significativa na análise dos resultados do planejamento. A máxima atividade lipásica

obtida foi de 9,14 U g⁻¹, nas condições de 1,5% de glicose, 65% de umidade e 1,5% de azeite de oliva.

2.3.3. EFEITO DOS MICRONUTRIENTES

A suplementação dos meios de cultivo com uma solução de minerais contendo ZnSO₄, Fe₂SO₄.7H₂O, Fe(NH₄)₂SO₂, CuSO₄.7H₂O, MnSO₄.H₂O, H₃BO₃ e Na₂MoO₄.2H₂O ocasionou aumento de três vezes na atividade enzimática dos meios contendo os óleos de gergelim e oliva, e de quatro vezes no meio contendo óleo de milho. Os elementos traços são geralmente componentes estruturais das enzimas (MAIA et al., 2001). Íons como Mg, Fe, Ca, Cu, Co, Na, K, Mn e Zn parecem influenciar positivamente a produção de lipases (SHARMA et al., 2001). Lin et al. (2006) reportaram que a adição de Ca, Mg, Fe, Na e K aumentaram a produção de lipase, enquanto Cu, Zn e Li apresentaram efeito inibitório na produção da enzima.

2.3.4. EFEITO DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS

Haq et al. (2002) estudaram temperaturas de cultivo de 25 a 45°C para a produção de lipases pelo microrganismo *R. oligosporous* por fermentação em estado sólido. Os melhores resultados foram obtidos a 30°C. Em altas e baixas temperaturas a energia requerida para a manutenção do microrganismo aumenta, diminuindo a formação de produtos. O pH inicial ótimo dos cultivos foi de 6,0. Os pHs iniciais de 5,5; 8,0 e 7,0 foram reportados como ótimos para os cultivos de *A. cinnamomea*, *R. glutinis* e *C. rugosa*, respectivamente (LIN et al., 2006).

As temperaturas na faixa de 26,5 a 32 °C foram utilizadas em inúmeros trabalhos de pesquisa de produção de lipases, sendo 30°C a temperatura utilizada com maior frequência. Os microrganismos utilizados variaram desde fungos, leveduras e bactérias. Quanto ao pH, foram utilizados pHs de 6,0 a 7,0 na maioria dos trabalhos revisados (LIN et al., 2006; ARMAS et al., 2005; BARON et al., 2005; DAMASO et al., 2005; D'ANNIBALE et al., 2005; FALONY et al., 2005; FERNÁNDEZ et al., 2005; GUTARRA et al., 2005; POZZA et al., 2005; YANG et al., 2005; BURKERT et al., 2004; TAN et al., 2003; MAHADIK et al., 2002).

Elibol e Ozer (2000) relataram a importância da transferência de oxigênio na produção de lipases por *Rhizopus arrhizus* via fermentação submersa, sendo que a implementação da transferência de oxigênio através de agitação e inserção de ar é um importante fator para a produção de lipases por microrganismos, em especial fungos filamentosos.

Cavalcanti et al. (2005) estudaram a influência da temperatura e do fluxo de ar na produção de lipases por fermentação em estado sólido em reatores de leito fixo e relataram a importância de elevados fluxos de ar nestes sistemas (fluxos de $0,8 \text{ L min}^{-1}$ ocasionaram as maiores produtividades), principalmente com o objetivo de remoção do calor gerado, já que a transferência de ar não constitui-se como um fator crítico nas fermentações em estado sólido.

2.4. BIOSURFACTANTES

2.4.1. DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

Os surfactantes são moléculas anfipáticas com uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, podendo ser sintéticos, obtidos a partir de sínteses químicas, ou biosurfactantes. Os biosurfactantes são compostos ativos em superfícies produzidos por microrganismos (DESAI e BANAT, 1997; KOSARIC e CAIRNS, 1987) ou através de síntese enzimática por enzimas produzidas por microrganismos (YU et al., 2008; KITTIKUM et al., 2008). Estes compostos têm recebido crescente interesse nas últimas décadas pelas vantagens que possuem sobre os surfactantes químicos, tais como biodegradabilidade, baixa toxicidade, produção a partir de fontes renováveis, funcionalidade sob condições extremas de pH e temperatura e estabilidade (VAN DYKE et al., 1991)

Os biosurfactantes são capazes de formar diversas estruturas tais como micelas, vesículas esféricas ou irregulares, estruturas lamelares, entre outras (CHAMPION et al., 1995). Eles se acumulam em interfaces apresentando diferentes polaridades, em especial óleo/água, ar/água e agindo como agentes umectantes em superfícies sólidas (água/sólido). Esse processo baseia-se na habilidade dos biosurfactantes em reduzir a tensão superficial pelo remanejamento molecular, através do acúmulo na superfície de compostos insolúveis, influenciando as ligações de hidrogênio e outras interações hidrofóbicas-hidrofílicas, aumentando a área superficial destes, levando a um aumento da biodisponibilidade e conseqüente biodegradabilidade (BARATHI e VASUDEVAN, 2001; ANNA, 2000; BOGNOLO et al., 1999).

Em comum com todas as moléculas que atuam em superfícies, os biosurfactantes contêm um ou mais grupos lipofílicos e hidrofílicos. Os grupamentos lipofílicos podem ser uma proteína ou um peptídeo, apresentando partes hidrofóbicas ou cadeias carbonadas de 10 a 18 carbonos. Já os grupos hidrofílicos são ésteres, hidróxi, fosfato, carboxila ou carboidratos (BOGNOLO, 1999; MORIKAWA et al., 1993). Todos os biosurfactantes sob diferentes condições e em diferentes sistemas mostram habilidade de reduzir a tensão superficial e interfacial de misturas óleo/água. Enquanto a maioria dos biosurfactantes não

afeta a viscosidade do óleo, em alguns casos uma pequena mudança na viscosidade pode ser notada devido à utilização de hidrocarbonetos parafínicos, isoparafinas, cicloalcanos e hidrocarbonetos policíclicos (KOSARIC e CAIRNS, 1987).

Os principais tipos de biossurfactantes podem ser divididos em glicolipídios, fosfolipídios, lipossacarídeos, lipopeptídeos, ácidos graxos e lipídios neutros (BOGNOLO 1999, MULLIGAN et al., 1999; KOSARIC e CAIRNS, 1987).

Os glicolipídios dividem-se em trealose, soforolipídios ou ramnolipídios, em geral envolvidos na assimilação de hidrocarbonetos de baixa polaridade por microrganismos. Holmberg (2001) define glicolipídios como hidróxi ácidos graxos ligados a uma molécula de açúcar através de uma ligação glicosídica, enquadrando nesta classe somente os ramnolipídios e os soforolipídios. Classifica a trealose como um acil-poliol, cuja diferença para os glicolipídios é que o ácido graxo está ligado a um dissacarídeo através de uma ligação éster.

Os fosfolipídios encontram-se presentes em todos os microrganismos, havendo poucos exemplos de produção extracelular, o mais notável é o biossurfactante produzido por *Corynebacterium lepus*. Já os lipossacarídeos são emulsificantes extracelulares solúveis em água, de alto peso molecular, produzidos por bactérias degradadoras de hidrocarbonetos como *Acinetobacter calcoaceticus*. Os lipopeptídios são produzidos pelo microrganismo *Bacillus subtilis*, sendo o biossurfactante mais utilizado a surfactina. Dentre os ácidos graxos e lipídios neutros os principais são ácido ustilágico, ácidos corinomicólicos, ácidos lipoteicóico e proteínas hidrofóbicas (HOLMBERG, 2001).

2.4.2. APLICAÇÕES DOS BIOSSURFACTANTES

O potencial de aplicação de compostos de superfície ativa produzidos a partir de microrganismos é baseado em suas propriedades funcionais, que incluem: emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, de-mulsificação, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Essas propriedades são aplicadas em campos diversos da agricultura, construção e nas indústrias alimentícias, de bebidas, papel, metal, têxtil, farmacêuticas e de cosméticos (NITSCHKE e PASTORE, 2002; MULLIGAN et al., 2001; BANAT et al., 2000; BOGNOLO, 1999; FIECHTER, 1992).

2.4.2.1. Indústria de alimentos

Os biossurfactantes apresentam características como emulsificação, formação de espumas, umidificação, solubilização, atividade antiadesiva e antimicrobiana, tolerância a pH, temperatura e concentração iônica, as quais podem ser aplicadas na indústria de alimentos.

Entretanto, apesar destas possíveis aplicações, poucos relatos têm sido encontrados sobre a aplicação destes compostos neste campo industrial (NITSCHKE e COSTA, 2007). Um dos trabalhos pioneiros nesta área foi desenvolvido por Shepherd et al. (1995), os quais estudaram a produção extracelular de emulsificantes de elevado peso molecular por bactérias, leveduras e algas. Foram isolados 24 compostos, dos quais nove foram selecionados por características de emulsificação, sendo produzidos por microrganismos como *Candida utilis*, *Candida ualida*, *Hansenula anomala*, *Rhodospiridium diobovatum* e *Rhodotorula graminis*, *Porphyridium cruentum*, *Klebsiella* spp. e *Acinetobacter calcoaceticus*. Destes, o biossurfactante extracelular produzido pela *C. utilis* foi selecionado por apresentar excelentes propriedades emulsificantes e devido ao grau alimentício do microrganismo. Os autores indicaram o bioemulsificante para uso em molhos de salada.

As características de biodegradabilidade e baixa toxicidade relacionadas aos biossurfactantes constituem-se em uma vantagem, aliado ao fato do crescente aumento da consciência da população a respeito do uso de compostos químicos artificiais, havendo o interesse pela substituição destes compostos por ingredientes e aditivos naturais.

Dentre as possíveis aplicações dos biossurfactantes na indústria de alimentos, a formação de emulsões é uma das principais. A formação de emulsões estáveis depende do equilíbrio entre as fases, óleo em água ou água em óleo. Neste sentido, os biossurfactantes de elevado peso molecular são melhores emulsificantes do que os de baixo peso molecular (NITSCHKE e COSTA, 2007), em especial os lipopeptídios e lipossacarídeos. Por exemplo, um lipopeptídio obtido de *B. subtilis* foi capaz de formar emulsões estáveis com óleo de soja e gordura de coco, sugerindo seu potencial de atuação como emulsificante em produtos alimentícios (NITSCHKE e PASTORE, 2006).

Outras possíveis aplicações incluem a redução da aglomeração de glóbulos de gordura, a estabilização de sistemas aerados, a melhoria da textura e vida útil de produtos contendo amido, a modificação das propriedades reológicas, a melhoria da consistência e textura de produtos contendo gordura. As características de anti-adesividade e como antimicrobianos tornam estes compostos importantes para o controle de microrganismos patogênicos nas superfícies de contato dos alimentos, evitando a formação de biofilmes (NITSCHKE e COSTA, 2007).

Além das aplicações dos biossurfactantes, a possibilidade de produção a partir de resíduos agroindustriais tem sido citada como outra vantagem destes compostos (NITSCHKE e COSTA, 2007; NITSCHKE e PASTORE, 2003).

2.4.2.2. Biorremediação

A biorremediação é uma tecnologia que utiliza o metabolismo de microrganismos para a eliminação rápida de poluentes presentes no ambiente ou a sua redução a níveis de concentração aceitáveis (HUY et al., 1999), tendo surgido para explorar a diversidade genética e a versatilidade metabólica dos microrganismos em transformar os contaminantes em produtos menos lesivos que podem ser integrados aos ciclos biogeoquímicos naturais.

A habilidade dos biossurfactantes em emulsificar misturas de hidrocarbonetos e água pode ser aplicada na biorremediação, contribuindo com a degradação de hidrocarbonetos no meio ambiente. Os biossurfactantes podem ser adicionados a solos ou águas contaminados com óleos, podendo ainda ser adicionados em biorreatores para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos. Outra alternativa é a adição de biossurfactantes ou microrganismos produtores de biossurfactantes ao solo para aumentar o crescimento de microrganismos indígenas (CAMEOTRA e BOLLAG, 2003).

Os biossurfactantes da classe raminolipídios (glicolipídio), produzidos a partir da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* SB30, foram utilizados para a remoção de óleo de cascalhos no derrame de óleo do navio Exxon Valdez no Alasca. Os resultados demonstraram que o bioemulsificante é duas a três vezes mais efetivo na remoção do óleo do que a água. O aumento na concentração do bioemulsificante até 1% e na temperatura até 50°C, levou a uma significativa melhora na remoção do óleo. Já o tempo de contato demonstrou um valor ótimo em torno de 1 min. Além da melhoria quantitativa na remoção, o bioemulsificante não apresentou toxicidade e apresentou maior biodegradabilidade (ANNA, 2000; HARVEY et al., 1990).

Alguns estudos demonstraram o aumento da biodisponibilidade de compostos aromáticos pouco solúveis como os aromáticos policíclicos (PHA) pelo uso de biossurfactantes, já que a grande dificuldade no processo de biodegradação desses compostos reside em sua alta hidrofobicidade, baixa solubilidade em água e grande capacidade de adsorção em solos (BANAT et al, 2000). O tratamento de amostras contaminadas por fenantreno e naftaleno com biossurfactantes resultou em aumento nas suas taxas de mineralização e solubilização.

A remoção de metais, que geralmente inclui a ação de ácidos, álcalis, complexantes, solventes solúveis em água, pode ser realizada pela ação de biossurfactantes. A surfactina, os raminolipídios e os soforolipídeos são capazes de remover cobre e zinco de solos contaminados com hidrocarbonetos, devido ao caráter aniônico destes surfactantes. A surfactina apresentou uma remoção de cobre de 70% e de hidrocarbonetos de 50%, comparados com valores de 20 e 30% de remoção de cobre e hidrocarbonetos por um surfactante químico (MULLIGAN et al., 2001).

Barathi e Vasudevan (2001) utilizaram uma cepa de *Pseudomonas fluorescens* isolada de um solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo e observaram a produção de biossurfactante durante a degradação de n-alcenos, principalmente o hexadecano, seguido do hexano, decano, querosene e óleo cru. A produção do biossurfactante ($0,58 \text{ g L}^{-1}$ em 24 h) foi observada durante o período de crescimento do microrganismo, com uma tensão superficial de 35 mN m^{-1} , apresentando atividade emulsificante em substratos como tolueno, hexano, óleo de girassol e querosene, além de hidrocarbonetos aromáticos como o naftaleno e fenantreno. A biodegradação de pireno e fenantreno em solos por *Pseudomonas aeruginosa* também foi reportada por Hwang e Cutright (2002). A produção de um raminolípido no meio extracelular foi observada por Wu e Ju (1998), sendo observada na deficiência de nitrogênio durante a fase estacionária de crescimento.

Huy et al. (1999) isolaram quatro cepas de bactérias em solos contaminados com petróleo no Vietnã, sendo três identificadas como *Pseudomonas* sp. e uma como *Acinetobacter* sp., esta com 95% de biodegradação de óleo cru (5%, v/v) contendo n-alcenos, n-alcenos e um composto heterocíclico (dibenzotiofeno) presente em pequenas quantidades, sendo este biodegradado com pouca eficiência. O biossurfactante produzido pela *Acinetobacter* sp. foi identificado como um polissacarídeo enquanto o produzido pelas *Pseudomonas* sp. como um glicolípido.

Martinez-Checa et al. (2002) estudaram a produção, a composição química e as propriedades funcionais de exopolissacarídeos produzidos por *Halomonas eurihalina* cepa H-28. Elevadas quantidades de biopolímeros foram sintetizadas em meio de cultivo composto por glicose e hexadecano, sendo o óleo cru emulsificado de forma mais efetiva do que com surfactantes sintéticos utilizados como controle, o que indica que os exopolissacarídeos produzidos apresentam-se como uma boa alternativa para a aplicação na indústria de óleos ou em processos de biorremediação.

Um actinomiceto isolado de solo Antártico (Dewart Island) e identificado como *Nocardioides* sp. A-8 apresentou crescimento em parafina como fonte de carbono, através da produção de um biossurfactante da classe dos glicolípídios, demonstrando propriedades de superfície e emulsificação, o que representa um potencial para aplicação na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos (VASILEVA-TONKOVA e GESHEVA, 2005).

2.4.2.3. Indústria farmacêutica e de cosméticos

Na indústria farmacêutica, os biossurfactantes podem ser aplicados como anticoagulante, além de apresentarem atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e

antitumoral. Exemplos de biossurfactantes que apresentam estas propriedades são a surfactina e a iturina (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes podem ser usados em produtos de higiene e cosméticos. A preparação de biossurfactantes pela ação enzimática (principalmente lipases) sobre moléculas hidrofóbicas promoveu um novo direcionamento na produção destes compostos, principalmente para utilização em produtos de higiene e cosméticos (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

2.4.2.4. Indústria do petróleo

Devido as suas propriedades físico-químicas, os biossurfactantes são melhores que os surfactantes sintéticos para uma série de aplicações na indústria de óleos, o que justifica o fato de que a maior parte dos biossurfactantes produzidos (400 a 500 t ano⁻¹) seja utilizada na indústria do petróleo, em atividades como a limpeza de reservatórios de óleos e na recuperação melhorada de petróleo (BOGNOLO, 1999).

A limpeza de tanques consiste na remoção de resíduos e frações de óleos pesados que sedimentam no fundo de tanques de estocagem. Estes resíduos são altamente viscosos e podem se tornar depósitos sólidos que não são removidos através de bombeamento convencional. A remoção requer lavagem com solventes ou limpeza manual, ambas perigosas, demoradas e caras. Outro problema é a preocupação com o destino das águas de lavagem e a perda econômica associada. Os métodos de limpeza baseiam-se na formação de emulsões concentradas de óleo em água através de agentes de superfície com posterior bombeamento da emulsão formada, seguida da quebra desta emulsão e recolhimento do óleo. Um processo alternativo de limpeza é o uso de biossurfactantes que promovem a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões O/A, facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru após quebra da emulsão. Os sólidos resultantes carregam uma quantidade limitada de óleo residual pela ação detergente do biossurfactante, tornando o descarte destes resíduos menos problemático. O bioemulsificante mais utilizado para este fim é o derivado da *Acinetobacter calcoaceticus*, denominado “emulsan”, cuja estrutura contém um ácido graxo e uma cadeia proteica ligada a um polissacarídeo (MULLIGAN et al., 2001; BOGNOLO, 1999).

A recuperação melhorada de petróleo (MEOR) consiste em uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo que utiliza microrganismos ou produtos de seu metabolismo para a recuperação de óleo residual. Os microrganismos de um reservatório de petróleo são estimulados a produzir polímeros e biossurfactantes, a fim de melhorar a recuperação do óleo pela diminuição da tensão interfacial na interface óleo-rocha,

promovendo a movimentação do mesmo através dos poros das rochas (NITSCHKE e PASTORE, 2002; BANAT et al., 2000).

2.4.3. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES PELOS MICRORGANISMOS

Os biossurfactantes podem ser produzidos por bactérias, leveduras e fungos filamentosos e apresentam grande diferença dos surfactantes sintéticos pela variabilidade na sua natureza hidrofóbica e hidrofílica (SHAFI e KHANNA, 1995). A composição e rendimento dos biossurfactantes dependem das características do fermentador, do pH do meio, da composição dos nutrientes, do substrato e da temperatura utilizada (MULLIGAN et al., 2001).

2.4.3.1. Vias metabólicas de produção de biossurfactantes

Os biossurfactantes são produzidos por uma variedade de microrganismos, secretados extracelularmente ou ligados às células durante o crescimento em substratos geralmente imiscíveis em água, possibilitando aos microrganismos utilizarem estes compostos, normalmente insolúveis em meio aquoso, o que impede a sua oxidação e assimilação (DESAI e BANAT, 1997; KOSARIC e CAIRNS, 1987). Entretanto, alguns microrganismos são capazes de produzir os biossurfactantes utilizando substratos solúveis em água.

A função do emulsificante para as células não é totalmente conhecida, mas pode ser a emulsificação de substratos insolúveis em água. Podem estar envolvidos na aderência das células, possibilitando a sobrevivência das mesmas em ambientes hostis (DESAI e BANAT, 1997).

As vias de síntese destas moléculas nos microrganismos envolvem primeiramente a formação das moléculas que irão constituir as porções hidrofóbicas e hidrofílicas do mesmo, estando envolvidos os mecanismos de biossíntese de ácidos graxos, carboidratos e derivados (KOSARIC e CAIRNS, 1987). A molécula do bioemulsificante geralmente é constituída por uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, sendo que estas podem ser sintetizadas a partir de vários mecanismos:

- a) as partes hidrofílica e hidrofóbica da molécula são sintetizadas através da síntese “de novo” por mecanismos independentes;
- b) a molécula hidrofílica é sintetizada através da síntese “de novo” enquanto a hidrofóbica é induzida pelo substrato;
- c) a molécula hidrofóbica é sintetizada através da síntese “de novo” enquanto a hidrofílica é induzida é dependente do substrato;

d) a síntese de ambas partes da molécula é dependente do substrato (DESAI e BANAT, 1997).

A assimilação de n-alcanos pelos microrganismos pode ocorrer através de três mecanismos:

a) assimilação de hidrocarbonetos dissolvidos no meio, geralmente cadeias carbonadas curtas (<10 carbonos) que apresentam solubilidade limitada em meio aquoso;

b) mecanismo de contato direto, no qual ocorre a formação de agregados compostos de células, gotas de hidrocarbonetos e ar, ocasionado um aumento na lipoficidade da superfície celular induzida pelo contato com o hidrocarboneto, que é absorvido pela célula através das camadas lipofílicas do envelope celular;

c) assimilação de hidrocarbonetos emulsificados, onde a partir do contato com a célula, o substrato é convertido em pequenas gotículas, ocasionando uma pseudo-solubilização através de agentes extracelulares produzidos pelas células (KOSARIC e CAIRNS, 1987).

Após a entrada na célula, os hidrocarbonetos são oxidados a álcoois, depois a aldeídos e posteriormente a ácidos graxos, através da oxidação terminal. Cadeias menores de ácidos graxos também podem ser obtidas pelo ataque em porções subterminais, obtendo-se álcoois secundários e cetonas, que após uma clivagem levam à formação de ácidos graxos de cadeias curtas. Apesar disto, a incorporação de hidrocarbonetos geralmente leva à presença nas moléculas de biossurfactantes de ácidos graxos de cadeia carbônica de mesmo número de carbonos que a fornecida pelo substrato. Estes ácidos graxos podem ainda sofrer alongação, dessaturação ou hidroxilação das cadeias carbônicas, ou serem oxidados até acetil-CoA ou propionil-CoA, via β -oxidação ou ainda α e ω -oxidação (KOSARIC e CAIRNS, 1987).

No caso de microrganismos que acumulam lipídios em grandes quantidades (> 25% do peso seco da célula), os ácidos graxos formados a partir da incorporação de hidrocarbonetos ou ácidos graxos no meio de cultivo podem ser esterificados ao glicerol para formarem mono, di e triacilgliceróis, a forma mais comum de reserva de lipídios em células eucarióticas (KOSARIC e CAIRNS, 1987).

A regulação da produção de bioemulsificantes pelos microrganismos pode envolver mecanismos de indução, repressão ou por regulação através da concentração de nitrogênio ou íons multivalentes. A indução ocorre através da adição de moléculas de hidrocarbonetos, ácidos graxos de cadeia longa ou glicerídios. A repressão pode ocorrer quando do uso concomitante de fontes de carbono simples, como glicose e ácidos orgânicos, e hidrocarbonetos. Nestes casos, a produção do bioemulsificante só ocorre após o

esgotamento da fonte de carbono simples. A produção de alguns biossurfactantes também pode ser regulada pela concentração de nitrogênio e íons metálicos, ocorrendo somente após a exaustão destas fontes de nutrientes. Em cultivos em batelada, o acúmulo de lipídios é favorecido quando no meio há um excesso da fonte de carbono sobre outros nutrientes limitantes. Há uma fase inicial de crescimento balanceado durante o qual todos os nutrientes são igualmente absorvidos. Os níveis lipídicos nesta fase mantêm-se inalterados e são modestos. Quando inicia a limitação de nutrientes a velocidade de crescimento decresce, mas o carbono continua sendo transportado para o interior das células e utilizado para a biossíntese de lipídios, sendo que os produtos finais formados nestas circunstâncias podem ser lipídios, polissacarídios, polímeros de estocagem como o poli-hidroxibutirato ou antibióticos. Nutrientes limitantes que podem levar a estas condições são o nitrogênio, magnésio, ferro e fósforo (KOSARIC e CAIRNS, 1987).

2.4.3.2. Cinética da produção de biossurfactantes

A cinética de produção de biossurfactantes por microrganismos pode ser classificada em quatro grupos principais: produção associada ao crescimento, sob condições de limitação do crescimento, por células imobilizadas ou com a suplementação de um precursor (DESAI e BANAT, 1997).

2.4.3.2.1. Produção associada ao crescimento

A produção associada ao crescimento ocorre quando há relação entre o crescimento, a utilização do substrato e a produção do emulsificante. Neste caso, a produção do emulsificante ocorre durante a fase exponencial de crescimento do microrganismo, onde ocorre a maior taxa de consumo de substrato e produção de produtos (DESAI e BANAT, 1997).

2.4.3.2.2. Produção sob condições de limitação do crescimento

A produção em condições de limitação do crescimento caracteriza-se pelo aumento da concentração de biossurfactantes como resultado da limitação de uma ou mais fontes de nutrientes do meio de cultivo. A maior produção do emulsificante pode ocorrer durante a fase estacionária de crescimento, onde ocorrem os casos de limitação de nutrientes. Exemplos de nutrientes que podem promover este padrão cinético são o nitrogênio, o ferro e o fósforo (DESAI e BANAT, 1997).

Kim et al. (2002) relatam um caso de produção de glicolipídios pelo microrganismo *Candida antarctica* em que a produção não está associada ao crescimento do microrganismo, ocorrendo na fase estacionária de crescimento. A fim de aumentar a produtividade do biossurfactante, os autores propuseram que o cultivo fosse realizado em dois estágios, de forma que a fase de produção fosse separada da fase de crescimento celular. Foram estudadas fontes de carbono que ocasionassem máximo crescimento celular e, posteriormente, outras fontes de carbono que otimizassem a produção do biossurfactante quando o microrganismo atingisse a fase estacionária de crescimento, sendo estas fontes adicionadas em modo batelada alimentada.

2.4.3.2.3. Produção por células imobilizadas

Nestes casos, não há multiplicação celular. As células, todavia, continuam a utilizar fontes de carbono para a produção de biossurfactantes. Isto permite uma importante redução nos custos de recolhimento do produto, visto que as fases de crescimento e a formação de produtos podem ser separadas (DESAI e BANAT, 1997).

2.4.3.2.4. Produção com suplementação de um precursor

A adição de precursores ao meio de cultivo pode ocasionar modificações qualitativas e quantitativas na produção de emulsificantes. A suplementação pode ser de substratos lipofílicos ou hidrofílicos (DESAI e BANAT, 1997).

2.4.3.3. Fatores que afetam a produção de biossurfactantes

Kosaric e Cairns (1987) revisaram os principais fatores que influenciam na produção de biossurfactantes por microrganismos, sendo os principais a fonte de carbono, fonte de nitrogênio e fatores ambientais como pH, temperatura, agitação e concentração salina.

2.4.3.3.1. Fontes de macronutrientes

Os macronutrientes de maior importância são o carbono e o nitrogênio, sendo relatados casos da influência das diferentes fontes destes compostos, bem como das concentrações presentes nos meios de cultivo sobre a produção dos biossurfactantes.

A uréia, os sais de amônio, o nitrato, os L-aminoácidos, tais como o ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina e glicina, entre outras fontes, podem ser assimiladas pelos microrganismos em processos de produção de biossurfactantes. Entretanto, máximas

produtividades geralmente são obtidas na limitação da fonte de nitrogênio, além de ocasionar modificações químicas na composição dos biossurfactantes (DESAI e BANAT, 1997).

As fontes de carbono solúveis (glicose, glicerol, manitol e etanol) e insolúveis (óleo de oliva e n-alcanos) foram utilizadas para a produção de raminolipídios por *Pseudomonas* spp, sendo a produção superior com a utilização de substratos insolúveis, com influência sobre a composição dos biossurfactantes produzidos.

Bento e Gaylarde (1996) determinaram a atividade emulsificante de quatro bactérias isoladas de solos contaminados com óleo diesel em meios contendo glicose e óleo diesel como fontes de carbono. Uma das bactérias isoladas apresentou baixa produção de emulsificantes quando a glicose foi usada como única fonte de carbono, mas a atividade aumentou rapidamente com a adição de óleo diesel, indicando que a produção do emulsificante é induzida pela presença de substratos insolúveis em água.

Vance-Harrop et al. (2003) usaram óleo de babassu e glicose como fontes de carbono para a produção de emulsificantes através de *Candida lipolitica*. Os melhores resultados foram atingidos com os meios adicionados de óleo de babassu (5%) em batelada alimentada.

A produção de soforolipídios ocorre em presença de carboidratos simples como substratos, no entanto, maiores rendimentos são obtidos pela adição concomitante de substratos hidrofóbicos (CAVALERO e COOPER, 2003; HOMMEL et al., 1994). Segundo estes autores, os substratos solúveis em água são primeiramente utilizados no metabolismo celular para a síntese da parcela hidrofílica da molécula do soforolipídio, enquanto os substratos lipofílicos são utilizados para a produção da porção do lipofílica, sendo incorporados diretamente na molécula do biossurfactante.

Kim et al. (2002) estudaram fontes de carbono e nitrogênio para a produção de glicolipídios a partir do microrganismo *Candida antarctica*. Dentre as fontes de carbono estudadas, o óleo de soja foi o mais efetivo na produção do biossurfactante. A glicose e o hexadecano não levaram à produção do produto. Dentre as fontes de nitrogênio estudadas, maiores quantidades de glicolipídios foram obtidas utilizando sais de amônio ao invés de nitratos ou nitritos, e o maior rendimento foi obtido com NH_4NO_3 , superior ao obtido com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NH_4Cl , o que foi atribuído ao menor decréscimo de pH durante o cultivo. O pH final com o nitrato de amônio foi de 4,5, enquanto que com os outros sais de amônio o pH foi de 2,5 ao final dos cultivos.

Ilori et al. (2005) estudaram o efeito das fontes de carbono e nitrogênio na produção de biossurfactantes por *Aeromonas* spp. Foram usadas como fontes de carbono o diesel+acetato, acetato, óleo cru, diesel, querosene e glicose. Estas foram adicionadas a um meio de cultivo padrão contendo NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 e MgSO_4 . Os experimentos foram

realizados a temperatura ambiente e agitação de 120 min^{-1} por 10 dias. O biossurfactante foi detectado nos meios de cultivo contendo diesel e acetato e acetato no 6º dia. Nos meios com diesel e glicose a detecção ocorreu no 2º dia. A maior produção do biossurfactante ocorreu com glicose no 4º dia e a menor com diesel e acetato no 10º dia. O diesel e o óleo cru foram boas fontes de carbono para a produção de biossurfactantes pelo microrganismo. Quando o diesel foi misturado ao acetato, a produção do biossurfactante foi tão baixa quanto quando foi utilizado o acetato somente. O organismo não foi capaz de utilizar o diesel na presença do acetato. Provavelmente o acetato é utilizado como primeira fonte de carbono quando ambas as fontes são adicionadas. A produção de metabólitos tóxicos pode ter ocasionado à inabilidade de utilização do diesel. A glicose foi utilizada pelo microrganismo como fonte de carbono, o que indica que a produção do biossurfactante ocorre na ausência de fontes hidrofóbicas de carbono.

As fontes de nitrogênio testadas foram o KNO_3 , NaNO_3 , NH_4NO_3 , peptona e soja, adicionadas a um meio de cultivo contendo Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 , MgSO_4 e hexadecano. Todos os sais testados e nutrientes foram utilizados pelo microrganismo como fontes de nitrogênio para a produção de biossurfactantes. A farinha de soja resultou em maiores concentrações do biossurfactante e o nitrato de sódio nas menores. A soja contém proteínas e amido, as quais são fontes de carbono e compostos minerais, estimulando o crescimento do microrganismo. Dentre os sais inorgânicos testados, o nitrato de amônio foi o que apresentou os melhores resultados (ILORI et al., 2005).

Davis et al. (1999) demonstraram a importância do metabolismo de utilização do nitrogênio pelo microrganismo *Bacillus subtilis* ATCC 21332 para a produção de surfactina. Foram testadas quatro condições de cultivo, sendo avaliados os parâmetros de conversão de células em produtos ($Y_{P/X}$) e a concentração de surfactina em mg L^{-1} no meio de cultivo, como mostrado na Tabela 1.

Foi demonstrado que a produção de surfactina é dependente da limitação de nitrato como fonte de nitrogênio no meio de cultivo. Quando em aerobiose (condição 2), o amônio foi consumido em 7 h de cultivo, sendo o nitrato utilizado como fonte de nitrogênio no tempo restante do experimento. A concentração de surfactina aumentou no período de utilização do nitrato e a taxa de produção do biossurfactante diminuiu quando houve a limitação da fonte de nitrogênio. Na condição 4, a limitação de oxigênio foi observada em 10 h de cultivo, caracterizando a anaerobiose. O amônio foi utilizado como fonte de nitrogênio no período aeróbio, sendo o nitrato utilizado quando em anaerobiose, mesmo ainda havendo amônio disponível. Isto foi explicado pelos autores pelo fato de que o *Bacillus subtilis* é conhecido por utilizar o nitrato como aceptor final na cadeia de transporte de elétrons. Uma evidência da utilização do nitrato na cadeia de transporte de elétrons foi o aumento da concentração de nitrito no meio de cultivo. A produção de surfactina aumentou após o consumo total do

nitrato. Concluiu-se que a produção de surfactina aumenta na limitação de nitrato em condições de anaerobiose (DAVIS et al., 1999).

Tabela 1 Condições de cultivo utilizadas para a produção de surfactina pelo microrganismo *Bacillus subtilis* ATCC 21332

| Condição de cultivo | [fonte de C] (g L ⁻¹) | [NH ₄ NO ₃] (g L ⁻¹) | Y _{P/X} | [surfactina] (mg L ⁻¹) |
|---|--------------------------------------|--|------------------|---------------------------------------|
| (1) Aerobiose/limitação da fonte de C | 10 | 4 | 0,0068 | 31,2 |
| (2) Aerobiose/limitação da fonte de N | 30 | 1 | 0,021 | 45,3 |
| (3) Anaerobiose/limitação da fonte de C | 20 | 6 | 0,0069 | 41,3 |
| (4) Anaerobiose/limitação da fonte de NO ₃ | 40 | 4 | 0,075 | 439,0 |

Fonte: DAVIS et al. (1999)

2.4.3.3.2. Fatores ambientais

Os fatores ambientais que influenciam na produção de biossurfactantes são: o pH, a temperatura, a concentração de oxigênio e a agitação.

O pH apresenta importância na produção de soforolipídios por *Torulopsis bombicola*. A produção de raminolipídios por *Pseudomonas* é máxima em pH de 6,0 a 6,5, diminuindo em pH acima de 7,0 (DESAI e BANAT, 1997). A máxima produção de glicolipídios por *Candida antarctica* ocorreu em pH inicial de 7,9, chegando a pH final de 4,5 ao final de 7 dias de cultivo. A produção do emulsificante foi inibida em pHs iniciais inferiores a 3, possivelmente devido aos pHs finais muito baixos alcançados ao final dos cultivos (KIM et al., 2002).

A temperatura pode causar alterações na composição dos biossurfactantes produzidos (DESAI e BANAT, 1997). Bicca et al. (1999) estudaram temperaturas de 30°C, 37°C e 40°C na produção de biossurfactantes por *Rhodococcus* AC 239, obtendo-se melhores resultados a 37°C.

Elevadas agitações podem resultar na redução da concentração do biossurfactante devido ao efeito da tensão cisalhante. Já a transferência de oxigênio é considerada como um parâmetro chave na otimização e aumento de escala da produção do biossurfactante surfactina (DESAI e BANAT, 1997).

Adamezak e Bednarski (2000) avaliaram a influência da composição do meio e da aeração na síntese de glicolipídios pelo microrganismo *Candida Antarctica*. Os cultivos foram realizados em modo submerso, a 30°C. As variáveis testadas foram: a fonte de carbono para o crescimento (óleo de soja, gordura de frango, glicose e lactose – 80 g L⁻¹), a pressão parcial de oxigênio no meio (25, 50 e 75%) e o fluxo de ar (1 e 2 v.v.m.). A melhor condição testada levou a produção de 45,5 g L⁻¹ do biosurfactante utilizando óleo de soja como fonte de carbono, pressão parcial de oxigênio de 50% e fluxo de ar de 1 v.v.m.

Guilmanov et al. (2002) objetivaram estudar a relação entre a aeração, o crescimento de microrganismo e a produção de soforolipídios por *Candida bombicola*. Os cultivos foram realizados em modo submerso através da adição do substrato em modo batelada alimentada. A fim de prevenir a inibição pelo produto final, o mesmo foi removido do meio de cultivo a cada 24 h. Os experimentos foram realizados a 30°C, com volumes iniciais de meio de 30, 70, 110 e 150 mL, com agitação crescente de 100 a 360 min⁻¹, aumentando 20 min⁻¹ d⁻¹ durante 13 dias. Quando a biomassa atingiu um patamar de crescimento, glicose (90 g L⁻¹) e ácido oléico (40 g L⁻¹) foram adicionados. O ácido oléico (40 g L⁻¹) foi adicionado posteriormente a cada 24 h durante 14 dias. Como os cultivos foram realizados em frascos de tamanho idêntico, os cultivos de maior volume representavam menor oxigenação e os com menores volumes representavam maior oxigenação. A variação da velocidade de agitação diversificou as condições de oxigenação, as quais foram medidas nos meios de cultivo. A maior produção de soforolipídios (50g L⁻¹d⁻¹) ocorreu nos frascos de 30 a 70 mL, os quais correspondiam a uma oxigenação de 50 mM O₂ L⁻¹ h⁻¹ a 80 mM O₂ L⁻¹ h⁻¹.

2.5. OTIMIZAÇÃO ESTATÍSTICA DE PROCESSOS

A otimização é um método utilizado para implementar a performance de sistemas e aumentar o rendimento destes sem o aumento dos custos (BAS e BOYACI, 2006). O uso de planejamentos experimentais estatísticos na otimização de processos fermentativos e meios de cultivo têm sido bem documentados. Há uma abundância de aplicações e estudos de caso na literatura. Uma aplicação completa do planejamento experimental inclui a seleção de variáveis seguida da otimização através de metodologia de superfície de resposta (COCKSHOTT e SULLIVAN, 2001).

A melhoria ou desenvolvimento de um processo, ou a formulação de um produto, requer o planejamento de um procedimento experimental a fim de avaliar os efeitos que suas variáveis independentes ou fatores têm sobre a(s) resposta(s). Isto pode ser realizado avaliando-se um fator por vez, mantendo as outras variáveis fixas ou variando-se todos os fatores conjuntamente (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

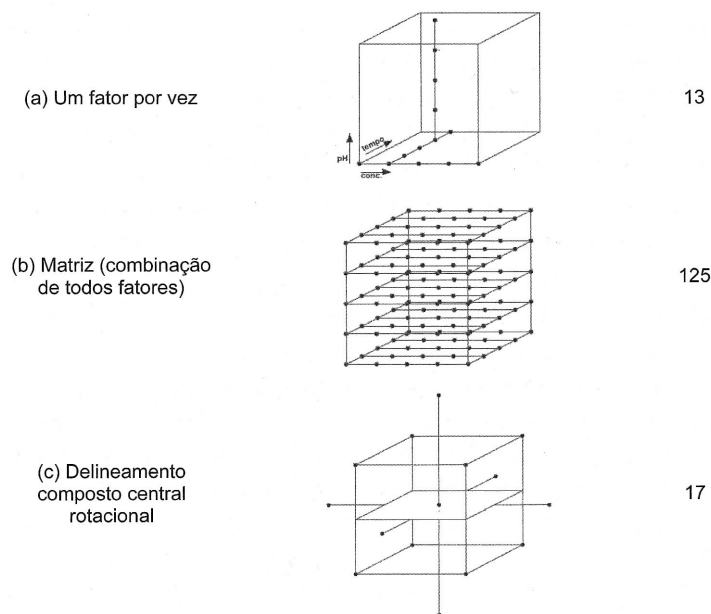
A primeira metodologia é o procedimento experimental mais difundido e usual, método denominado “one-at-a-time” ou estudo de uma variável por vez, onde se avalia uma variável em diferentes condições e as demais variáveis são fixadas. Posteriormente, o melhor valor encontrado é fixado e as outras variáveis são alteradas até que todas sejam consideradas. Este método pode ser usado, mas não prevê as interações entre as variáveis, conforme exemplificado na Figura 4(a). Este estudo necessitaria de 13 ensaios para a obtenção da melhor resposta desejada. No entanto, as condições estudadas ficariam limitadas àquela região espacial, não sendo possível detectar efeitos de interação entre elas, sendo que o melhor resultado obtido fica sempre muito aquém do valor otimizado (BAS e BOYACI, 2006; RODRIGUES e IEMMA, 2005).

O segundo método obtém o resultado através de uma matriz de todas as combinações até a obtenção de uma solução. Este método tem a vantagem de explorar todo o espaço experimental, mas necessita de um grande número de experimentos (125, para 3 variáveis variando em 5 níveis cada: $5 \times 5 \times 5$), conforme Figura 4(b). Este procedimento é demorado, de custo muito alto e, por não possuir nenhum ensaio repetido não permite o cálculo do erro padrão inerente às manipulações experimentais (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

A resolução do problema através de um planejamento estatístico conhecido como planejamento experimental fatorial (Figura 4c) para a solução do projeto experimental pode ser feita usando um número menor de medidas e explorando todo o espaço experimental. Neste caso, é necessária a realização de 17 ensaios (8 ensaios fatoriais representados pelos vértices do cubo + 6 ensaios nos pontos axiais para testar o modelo de 2ª ordem + 3 ensaios no ponto central para o cálculo do erro padrão do experimento). A região de estudo é maior com um número menor de ensaios a serem realizados, podendo-se calcular o erro experimental, indispensável para avaliar a reprodutibilidade do processo. É possível, ainda, elaborar um modelo matemático, que, se validado estatisticamente, pode ser usado para a obtenção da superfície de resposta e através desta análise se determinar as condições otimizadas (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

O número de planejamentos experimentais fatoriais necessários para a otimização de um processo depende do número de variáveis independentes a serem estudadas inicialmente. No caso de 2 ou 3 variáveis independentes ou fatores, devem-se usar os delineamentos fatoriais completos e, na seqüência da otimização, os delineamentos compostos centrais rotacionais, também conhecidos como metodologia de superfície de resposta. Para o estudo de 4 ou mais variáveis deve-se utilizar planejamentos fracionários ou planejamentos tipo Plackett-Burman para uma investigação inicial em relação aos efeitos das variáveis estudadas sobre as respostas desejadas. Para se obter a otimização será necessário outro planejamento com 2 ou 3 variáveis, dependendo do resultado do

planejamento fracionado. O uso de um planejamento composto central sem a realização prévia de um planejamento fracionado no caso de muitas variáveis resultaria em um número muito grande de ensaios sem a garantia da otimização direta. O planejamento fracionário permite a exploração das variáveis previamente à otimização (RODRIGUES e IEMMA, 2005).



Fonte: Haaland apud RODRIGUES e IEMMA (2005)

Figura 4 Possibilidades de conduzir experimentos para 3 variáveis estudadas. (a) Análise de uma variável por vez, (b) matriz com todas as combinações possíveis e (c) delineamento composto central rotacional

2.5.1. EXEMPLOS DE UTILIZAÇÃO DE PLANEJAMENTOS ESTATÍSTICOS

Cockshott e Sullivan (2001) utilizaram planejamentos estatísticos seqüenciais para a otimização de um meio para a produção de equinocandina B por *Aspergillus nidulans* em fermentação submersa. O Quadro 4 apresenta um resumo dos planejamentos experimentais utilizados para a otimização do meio.

Na primeira etapa foi utilizado um planejamento Plackett Burman com 20 tratamentos e 3 pontos centrais, sendo avaliadas 15 variáveis. Na seqüência, as cinco variáveis de maior significância foram utilizadas em um planejamento fatorial fracionário 2^5 com 2 pontos centrais, em 2 blocos de $\frac{1}{2}$ fração, totalizando 18 experimentos em cada bloco. As variáveis do PB não significativas ou com efeitos negativos foram ignoradas (COCKSHOT e SULLIVAN, 2001).

No caso dos planejamentos Plackett Burman, o efeito da curvatura indica como as variáveis precisam ser direcionadas para atingirem a região de ótimo. A metodologia de superfície de resposta é apropriada quando a região de ótimo é identificada. Com a obtenção destes dados, o pesquisador pode aproximar a função resposta para um modelo de 2ª ordem, as condições de ótimo podem ser determinadas experimentalmente e confirmadas através de experimentação. A condição necessária para um único ponto de máximo é a presença de efeitos quadráticos negativos (COCKSHOTT e SULLIVAN, 2001).

Quadro 4 Resumo dos planejamentos experimentais utilizados na otimização do meio para a produção de equinocandina B por *A. nidulans* em fermentação submersa

| Planejamentos | Objetivo |
|---|---|
| Plackett Burman | Avaliar o impacto individual de cada componente do meio sobre a produção de equinocandina B objetivando focar os futuros experimentos nos componentes críticos do meio de cultivo |
| Planejamento fatorial completo 2 ⁵ | Quantificar os efeitos individuais e de interação dos 5 fatores críticos a fim de localizar a região de ótimo |
| Otimização | Aumentar o planejamento fatorial completo com os pontos axiais e pontos centrais adicionais a fim de completar o planejamento de superfície de resposta e confirmar a região de ótimo |
| Confirmação | Utilização da análise de curvatura para investigar regiões de ótimo promissoras como determinado pela superfície de resposta |

Fonte: COCKSHOTT e SULLIVAN (2001)

Se a curvatura do estágio fatorial é insignificante e os fatores lineares são significativos, indica que a superfície de resposta é linear e a região de ótimo está fora da região de estudo. Nesta situação deve-se buscar a região de ótimo através do método do caminho ascendente. Este método utiliza a magnitude e o sinal dos efeitos lineares para determinar a região de onde se obterão as respostas máximas. O caminho dos novos experimentos inicia no centro do espaço experimental atual em direção externa a este. As

respostas destes experimentos são plotadas até a identificação do centro de uma nova região que conterà a região de ótimo (COCKSHOTT e SULLIVAN, 2001).

Na análise do experimento fatorial 2^5 , os autores obtiveram $p=0,121$ para a curvatura do modelo e várias interações de variáveis significativas. Neste, caso, como o efeito da curvatura não foi significativo, porém indicativo de curvatura e as interações foram significativas, a presença da curvatura é evidente. Neste caso, o método do caminho ascendente é inapropriado, sendo utilizado o método de curvatura ascendente, que inclui pontos axiais e novos pontos centrais ao planejamento. Assim, totalizando, os autores utilizaram um planejamento fatorial completo com 32 experimentos, somados a 7 pontos centrais e 10 pontos axiais (2 por variável) (COCKSHOTT e SULLIVAN, 2001).

O efeito das interações entre variáveis (% óleo de girassol, % peptona, % glicose, período de incubação e velocidade de agitação) sobre a produção de lipases por *Aspergillus carneus* foi estudado por Kaushik et al. (2006). Cada variável foi avaliada em três níveis (-1,0,+1) através de um planejamento de face centrada, num total de 32 experimentos. A resposta utilizada foi a máxima atividade lipolítica obtida. A modelo gerado está apresentado na Equação 1, sendo: Y a resposta predita pelo modelo; β_0 a média; $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$ e β_5 os coeficientes lineares; $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}, \beta_{44}$ e β_{55} os coeficientes quadráticos; $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{15}, \beta_{23}, \beta_{24}, \beta_{25}, \beta_{34}, \beta_{35}$ e β_{45} , os coeficientes de interação. Os níveis das variáveis foram gerados a partir das melhores respostas obtidas em experimentos prévios realizados variando-se uma variável por vez, sendo mostrados na Tabela 2.

$$Y = \beta_0 + \beta_1.A + \beta_2.B + \beta_3.C + \beta_4.D + \beta_5.E + \beta_{11}.A^2 + \beta_{22}.B^2 + \beta_{33}.C^2 + \beta_{44}.D^2 + \beta_{55}.E^2 + \beta_{12}.AB + \beta_{13}.AC + \beta_{14}.AD + \beta_{15}.AE + \beta_{23}.BC + \beta_{24}.BD + \beta_{25}.BE + \beta_{34}.CD + \beta_{35}.CE + \beta_{45}.DE \quad (1)$$

Tabela 2 Níveis das variáveis utilizadas na otimização da produção de lipase por *A. carneus* através de um Planejamento de Face Centrada

| Variável/nível | -1 | 0 | +1 |
|--------------------------------|-----|-----|-----|
| Óleo de girassol (%) | 1 | 1,5 | 2 |
| Peptona (%) | 0,2 | 0,5 | 0,8 |
| Glicose (%) | 0,8 | 1,0 | 1,2 |
| Agitação (min^{-1}) | 200 | 250 | 300 |
| Tempo de incubação (h) | 72 | 96 | 120 |

Fonte: KAUSHIK et al (2006)

A atividade lipásica máxima obtida na otimização foi de $12,7 \text{ U mL}^{-1}$ em 96 h de incubação, utilizando-se 1% de óleo de girassol, 0,8% de glicose, 0,8% de peptona e

agitação de 200 min⁻¹, em comparação com 7,2 U mL⁻¹ obtida nos experimentos variando-se uma variável por vez. Para validação do modelo foram realizados 6 experimentos com diferentes níveis de óleo de girassol, glicose e velocidades de agitação e mantendo-se fixas a concentração de peptona em 0,8% e o tempo de incubação em 96 h, visto estas variáveis não terem apresentado significância estatística em um intervalo de confiança de 95%. Foram confirmados os melhores níveis das variáveis significativas conforme o modelo quadrático gerado, sendo a máxima atividade enzimática de 12,67 U mL⁻¹ (KAUSHIK et al., 2006).

Vohra e Satyanarayana (2002) estudaram a produção de fitase por *Pichia anomala* através da metodologia de superfície de resposta. O meio de cultivo utilizado foi primeiramente otimizado variando-se uma variável por vez. As variáveis experimentais foram as concentrações de glicose (A) e extrato de carne (B) e a concentração inicial de inóculo (C). Utilizou-se um DCCR composto por 8 experimentos (2³) + 6 pontos axiais e 6 pontos centrais. O modelo de 2^a ordem gerado está apresentado na Equação 2. Os coeficientes de primeira e segunda ordem e de interação encontrados são apresentados na Tabela 3. Os parâmetros A, B e B₂ foram significativos no modelo. A validação do modelo foi realizada em um experimento com concentração de glicose (A) de 0,5%, extrato de carne (B) de 0,1% e concentração inicial de inóculo de 1,5%, sendo obtida uma atividade enzimática de 139 U g⁻¹. O valor de atividade enzimática predito pelo modelo nestas condições foi de 131 U g⁻¹.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot A + \beta_2 \cdot B + \beta_3 \cdot C + \beta_{11} \cdot A^2 + \beta_{22} \cdot B^2 + \beta_{33} \cdot C^2 + \beta_{12} \cdot AB + \beta_{13} \cdot AC + \beta_{23} \cdot BC \quad (2)$$

Tabela 3 Coeficientes de primeira e segunda ordem e de interação para o modelo de 2^o ordem gerado na otimização da produção de fitase por *Pichia anomala* através da metodologia de superfície de resposta

| β_0 | β_1 | β_2 | β_3 | β_{11} | β_{22} | β_{33} | β_{12} | β_{13} | β_{23} |
|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 131,44 | -3,02 | -71,44 | 12,75 | 0,1 | 8,86 | -0,5 | 2,09 | -2,02 | -2,41 |

Fonte: VOHRA e SATYANARAYANA (2002)

Elibol e Ozer (2002) estudaram os efeitos da concentração inicial de glicose e da concentração de óleo de milho como indutor da produção de lipase por *Rhizopus arrhizus* através de um planejamento composto central rotacional, cujos níveis reais e codificados estão apresentados na Tabela 4. A avaliação estatística do planejamento gerou um modelo de 2^a ordem com R² de 0,98. A máxima atividade lipolítica obtida foi de 300 μM min⁻¹ utilizando-se 1 g L⁻¹ de glicose e 2,7 g L⁻¹ de óleo de milho.

Kalil et al. (2000) estudaram a otimização do rendimento e produtividade de uma fermentação alcoólica contínua. Primeiramente, um planejamento Plackett Burman de 20 experimentos foi utilizado para a seleção de variáveis significativas no processo, tendo sido avaliadas 10 variáveis. Destas, cinco apresentaram significância estatística sobre o processo, sendo estudadas, em uma segunda etapa, a partir de um delineamento composto central ortogonal composto por 32 experimentos referentes ao planejamento fatorial completo (2^5), 10 experimentos referentes à adição dos pontos axiais e 1 experimento no ponto central (somente um ponto central foi adicionado visto ser um trabalho de simulação).

Tabela 4 Níveis reais e codificados das variáveis utilizadas na otimização da produção de lipase por *Rhizopus arrhizus*

| Variáveis/Níveis | - α | -1 | 0 | +1 | + α |
|------------------------------------|------------|------|------|-------|------------|
| Glicose (g L ⁻¹) | 1 | 3,25 | 5,5 | 7,75 | 10 |
| Óleo de milho (g L ⁻¹) | 1 | 5,75 | 10,5 | 15,25 | 20 |

Fonte: ELIBOL e OZER (2002)

Souza et al. (2006) realizaram a otimização da composição de um meio de cultivo para a produção de transglutaminase de *Bacillus circulans* BL32. Sete componentes do meio de cultivo foram testados em duas concentrações através um planejamento Plackett Burman de 12 experimentos. Dos sete componentes estudados, apenas 2 apresentaram-se com significância estatística ($p < 0,05$) sobre a produção de transglutaminase. Em uma segunda etapa, a concentração destes componentes foi estudada através de um Delineamento Composto Central Rotacional de duas variáveis, num total de 12 experimentos.

Burkert et al. (2004) otimizaram a produção de lipase pelo fungo *Geotrichum* sp. através de técnicas seqüenciais de planejamento experimental. As variáveis de estudo foram a concentração de glicose, a concentração da água de maceração de milho, a concentração da fonte de nitrogênio (nitrato de amônio) e o tipo de óleo adicionado como indutor (óleo de soja ou azeite de oliva na concentração de 1%). Foram realizados 5 planejamentos experimentais, sendo o primeiro um planejamento fatorial completo tipo 2^4 com seis pontos centrais, onde a glicose não apresentou efeito significativo sobre a produção da enzima, sendo excluída dos demais planejamentos. Dois planejamentos do tipo 2^3 com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais foram realizados utilizando-se como variáveis as concentrações de azeite de oliva, nitrato de amônio e água de maceração de milho. O mesmo foi realizado utilizando-se o óleo de soja como indutor. A composição ótima do meio de cultivo foi obtida com concentrações de nitrato de amônio entre 2,1% e 2,5%, com 13% a 15% de água de maceração de milho e 0,6% de óleo de soja, obtendo-se atividade lipásica

de 20 U mL⁻¹. Utilizando-se azeite de oliva como indutor, o meio ótimo apresentou 0,8 a 1% de nitrato de amônio, 13 a 15% de água de maceração de milho e 0,6% de azeite de oliva, alcançando-se uma atividade enzimática de 17 U mL⁻¹.

CAPÍTULO III: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamezak, M. e Bednarki, W. Influence of médium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida Antarctica*. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 313-316, 2000.

Anna, L.M.M.S. **Produção de biosurfactantes do tipo raminolipídeo por *Pseudomonas sp.*** Tese de mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro/RJ, 2000.

Antczak, M.S.; Kubiak, A.; Antczak, T.; Bielecki, S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, n. 5, p. 1185-1194, 2009.

Armas, J.C.; Mendoza, J.C.D.; Jústiz, O.H. Lipase expression by *Mucor griseocyanus* cultures on different substrates, **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Recife, 2005.

Banat, I.; Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

Barathi, S.; Vasudevan, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. **Environment International**, v. 26, p. 413-416, 2001.

Baron, A.M.; Turra, V.M.Z.; Mitchell, D.A.; Krieger, N. Produção e caracterização de lipases de *Penicillium corylophilum* IOC 4211. **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Recife, 2005.

Bas, D.; Boyaci, I.H. Modeling and optimization II: Comparison of estimation capabilities of response surface methodology with artificial neural networks in a biochemical reaction. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 3, p. 846-854, 2007.

Bento, F.M. e Gaylarde, C.C. The production of interfacial emulsions by bacterial isolates from diesel fuels. **International Biodeterioration and Biodegradation**, p. 31-33, 1996.

Bicca, F.C.; Fleck, L.C.; Ayub, M.A.Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus rubber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 231-236, 1999.

Bognolo, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hidrocarbons. **Colloids and Surfaces**, v. 152, p. 41-52, 1999.

Burkert, J.F.M.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum sp.* using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 77-84, 2004.

Cameotra, S.S.; Bollag, J.M. Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 30, n. 2, p. 111–126, 2003.

Carli, I.C. Síntese de ésteres derivados de carboidratos com propriedades surfactantes utilizando lipases imobilizadas em suporte sólido. Dissertação de Mestrado em Química – Universidade Regional de Blumenau. Blumenau- SC, 2006.

Carvalho, P.O.; Campos, P.R.B.; Noffs, M.D.; Oliveira, J.G.; Shimizu, M.T.; Silva, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

Castro, H.F.; Mendes, A.A.; Santos, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química nova**, v. 27, n. 1, p. 146 – 156, 2004.

Cauglia, F.; Canepa, P. The enzymatic synthesis of glucosylmyristate as a reaction model for general considerations on 'sugar esters' production. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4065-4072, 2008.

Cavalcanti, E.A.C.; Gutarra, M.L.E.; Freire, D.M.G.; Castilho, L.R.; Sant'Anna Júnior, G.L. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p. 79-84, 2005.

Cavalero, D.A. e Cooper, D.G. The effect of médium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC22214. **Journal of Biotechnology**, v. 103, p. 31-41, 2003.

Champion, J.T.; Gilkey, J.C.; Lamparski, H.; Retterer, J.; Miller, R.M. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 170, p. 569-574, 1995.

Cockshott, A.R.; Sullivan, G.R. Improving the fermentation medium for Echiocandin B production. Part I: sequential statistical experimental design. **Process Biochemistry** v. 36, p. 647-660, 2001.

Colen, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Tese de doutorado. Faculdade de Farmácia da UFMG. Belo Horizonte, MG, 2006.

Cordova, J.; Memmaoui, M.; Ismaili-Alaoui, M.; Morin, A.; Roussos, S.; Raimbault, M.; Benjilali, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.5, p. 75-78, 1998.

Costa Neto, P.R. **Obtenção de ésteres etílicos (Biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja**. Tese de doutorado em química – Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

D'Annibale, A., Sermanni, G.G., Federici, F., Petruccioli, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 15, p. 1828-1833, 2006.

Dalmau, E.; Montesinos, J.L.; Lotti, M.; Casas, C. Effect of different carbon source on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 23, p. 657-663, 2000.

Damaso, M.C.T.; Couri, S.; Passianoto, M.A.; Freitas, S.C. Produção de lipases por fermentação semi-sólida tendo como indutores da síntese, subprodutos do refino do óleo de milho. **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Recife, 2005.

Davis, D.A.; Lynch, H.C.; Varley, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 322-329, 1999.

Deleu, M.; Paquot, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **C. R. Chimie**, v. 7, p. 641–64, 2004.

Desai, J.D. e Banat, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p. 47-64, 1997.

Dizge, N.; Keskinler, B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 1274–1278, 2008.

Dupuis, C.; Corre, C.; Boyaval, P. Lipase and esterase activities of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*. **Applied and environmental microbiology**, v.59, n.12, p. 4004 4009, 1993.

Elibol, M.; Ozer, D. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry** 38: 367-372, 2002.

Ellaiah, P.; Prabhakar, T.; Ramadrishna, B.; Thaer Taleb, A.; Adinarayana, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 525-528, 2004.

Falony, G.; Mendonza, J.C.D.; Armas, J.C. Obtention of *A. niger* lipases by solid state fermentation. **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Recife, 2005.

Fernandes, M.L.; Meira, J.A.; Mitchell, D.A. Krieger, N. Produção da lipase de *Bacillus megaterium* por PES para aplicação em biocatálise. **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Recife, 2005

Fiechter, A. Biosurfactantes: moving towards industrial application. **Trends in Food Science and Technology**, v. 31, p. 283-293, 1992.

Guilmanov, V.; Ballistreri, A.; Impallomeni, G. Oxygen transfer rate and sophorose lipid production by *Candida bombicola*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, n. 5, p. 489-494, 2002.

Gutarra, M.L.E.; Castilho, L.R.; Freire, D.M.G. Seleção de fungos produtores de lipase por fermentação em estado sólido. **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Recife, 2005.

Habulin, M.; Sabeder, S.; Paljevac, M.; Primozic, M.; Knez, Z. Lipase-catalyzed esterification of citronellol with lauric acid in super critical carbon dioxide/co-solvent media. **J. of Supercritical Fluids**, v. 43, p. 199–203, 2007.

Haq, I.; Idrees, S.; Rajoka, M.I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 637-341, 2002.

Harvey, S.; Elashvilli, I.; Valdes, J.J.; Kamely, D.; Chakrabarty, M. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by microbial surfactant. **Biotechnology**, v. 8, p. 228-230, 1990.

Hasan, F.; Shah, A.A.; Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

Holmberg, K. Natural surfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 6, p. 148-159, 2001.

Hommel, R.K.; Weber, L.; Wiss, A.; Haferburg, D.; Kleber, H.P. Production of sophorose lipids by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose. **J. Biotechnol.**, v. 33, p. 147-155, 1994.

Houde, A.; Kademi, A.; Leblanc, D. Lipases and their applications: an overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v.118, n.1-3, p.155-170, 2004.

Huy, N.Q.; Jin, S.; Amada, K.; Haruki, M.; Huu, N.; Hang, D. T.; Há, D.T.C.; Imanaka, T.; Morikawa, M.; Kanaya, S. Characterization of petroleum-degrading bacteria from oil-contaminated sites in Vietnam. **Journal of Bioscience and Bioengineering** v. 88, n.1, p. 100-102, 1999.

Hwang, S.; Cutright, T.J. Bio degradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. **Chemosphere** v. 47, p. 891-899, 2002.

Ilori, M.O.; Amobi, C.J.; Odocha, A.C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. Isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v. 61, p. 985-992, 2005.

Iyer, P.V.; Ananthanarayan, L. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1019–1032, 2008.

Jaeger, K.E.; Reetz, T.M. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnology**, v.16, p. 396-403, 1998.

Kalil, S.J.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 539-550, 2000.

Kaushik, R.; Saran, S.; Isar, J.; Saxena, R.K. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p.121-126, 2006.

Kim, H. S.; Jeon, J.W.; Lee, H. W.; Park, Y.I.; Seo, W.T.; Oh, H.M., Katsuragi, T.; Tani, Y.; Yoon, B.D. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida Antarctica*. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 225-229, 2002.

Kim, H.J.; Youn, S.H.; Shin, C.S. Lipase-catalyzed synthesis of sorbitol–fatty acid esters at extremely high substrate concentrations. **Journal of Biotechnology**, v.123, n. 2, p. 174-184, 2006.

Kittikun, A.H.; Kaewthong, W.; Cheirsilp, B. Continuous production of monoacylglycerols from palm olein in packed-bed reactor with immobilized lipase PS. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 1, p. 116-120, 2008.

Kosaric, N. e Cairns, W. L. **Biosurfactants and Biotechnology**. Marcel Dekker, Inc., New York. P. 21-46 e 47-88, 1987.

Leal, M.C.M.R.; Cammarota, M.C.C., Freire, D.M.G.; Sant'Anna Jr., G.L. Hydrolytic enzymes as adjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 175-180, 2002.

Lin, E.S.; Wang, C.C.; Sung, S.C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 98-102, 2006.

Macedo, G.; Macedo, J. Biodiesel. **Biociência e Desenvolvimento**, n.32, p. 38-46, 2004.

Mahadik, N.D.; Puntambekar, U.S.; Bastawde, K.B.; Khire, J.M.; Gokhale, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.

Maia, M.M.D.; Heasley, A.; Camargo, M.M.M.; 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, p. 23-27, 2001.

Martinez-Checa, F.; Toledo, F.L.; Vilchez, R.; Quesada, E.; Calvo, C. Yield production, chemical composition and functional properties of emulsifier H28 synthesized by *Halomonas eurihalina* strain H-28 in media containing various hydrocarbons. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 58, p. 358-363, 2002.

Mendes, A.A.; Castro, H.F.. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v.28, n. 2, p. 296 – 305, 2005.

Morikawa, M.; Daido, H.; Takao, T.; Murata, S.; Shimonishi, T.; Imanaka, T. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 6459-6466, 1993.

Mulligan, C. N.; Yong, R. N.; Gibbs, B. F. On the use of biosurfactants for the removal of heavy metals from oil-contaminated soil. **Environmental Progress**, v. 18, p. 31-35, 1999.

Mulligan, C. N.; Yong, R. N.; Gibbs, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, p. 371-380, 2001.

Nitschke, M.; Costa, S.G.V.A.O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, p. 252 a 259; 2007.

Nitschke, M.; Pastore, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 336 341, 2006.

Nitschke, M.; Pastore, G.M. Biosurfactantes a partir de resíduos agroindustriais. **Biociência**, v. 13, n. 1, p. 63-67, 2003.

Nitschke, M.; Pastore, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

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

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

Paul, D.; Pandey, G.; Pandey, J.; Jain, R.K. Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 135-142, 2005.

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

Pozza, E.L.; Maldonado, R.R.; Maugeri Filho, F.; Rodrigues, M.I. Estudo da etapa de upstream e purificação da lipase de *Geotrichum candidum* produzida com meios industriais. **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Recife, 2005.

Raimbault, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 174-188, 1998.

Reguly, J.C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. v. 3. Pelotas: Editora Universitária – UFPel, 2000.

Reshma, M.V.; Saritha, S.S.; Balachandran, C.; Arumughan, C. Lipase catalyzed interesterification of palm stearin and rice bran oil blends for preparation of zero trans shortening with bioactive phytochemicals. **Bioresour Technol.**, v. 99, n. 11, p.5011-5019, 2008.

Rodrigues, M.I.; Lemma, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1ª ed. Campinas-SP: Casa do Pão Editora, 2005. ISBN 85-98389-03-X.

Rosa, D.R.; Cammarota, M.C.; Freire, D.M.G. Tratamento biológico/enzimático de efluente com alto teor de gordura. **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Recife, 2005

Saad, E.B. **Etanolise do óleo de milho empregando catalisadores alcalinos e enzimáticos**. Dissertação de mestrado. Curso de Pós-Graduação em Química – Área de Química Orgânica, do Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, 2005.

Sabeder, S.; Habulin, M.; Knez, Z. Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 880–88, 2006.

Saisubramanian, N.; Edwinoliver, N.G.; Nandakumar, N.; Kamini, N.R.; Puvanakrishnan, R. Efficacy of lipase from *Aspergillus niger* as an additive in detergent formulations: a statistical approach. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 33, p. 669-676, 2006.

Salah, R.B.; Ghamghui, H.; Miled, N. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 368–372, 2007.

Schmidell, W.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Lima, U. A. **Biotecnologia Industrial**. V. 2. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001.

Shafi, R.; Khanna, S. Biosurfactants. **Indian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 163-184, 1995.

Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, Y. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

Shepherd, R.; Rockey, J.; Sutherland, W.; Roller, S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, V. 40, P. 207-217, 1995.

Souza, C.F.V.; Flôres, S.H.; Ayub, M.A.Z. Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL32 using statistical experimental methods. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1186-1192, 2006.

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.

Van Dyke, M.I.; Lee, H e Trevors, J.T. Applications of microbial surfactants. **Biotechnology Advances**, v. 9, p. 241-252, 1991.

Vance-Harrop, M.H.; Gusmão, N.B.; Takaki, G.M.C. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 120-123, 2003.

Vasileva-Tonkova, E.; Gesheva, V. Glycolipids produced by *Antarctic nocardioides* sp. during growth on n-paraffin. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2387–239, 2005.

Vohra, A.; Satyanarayana, T. Statistical optimization of the medium components by response surface methology to enhance phytase production by *Pichia anomala*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 999-1004, 2002.

Wu, J.; Ju, L.K. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, v. 59, p. 193-202, 1998.

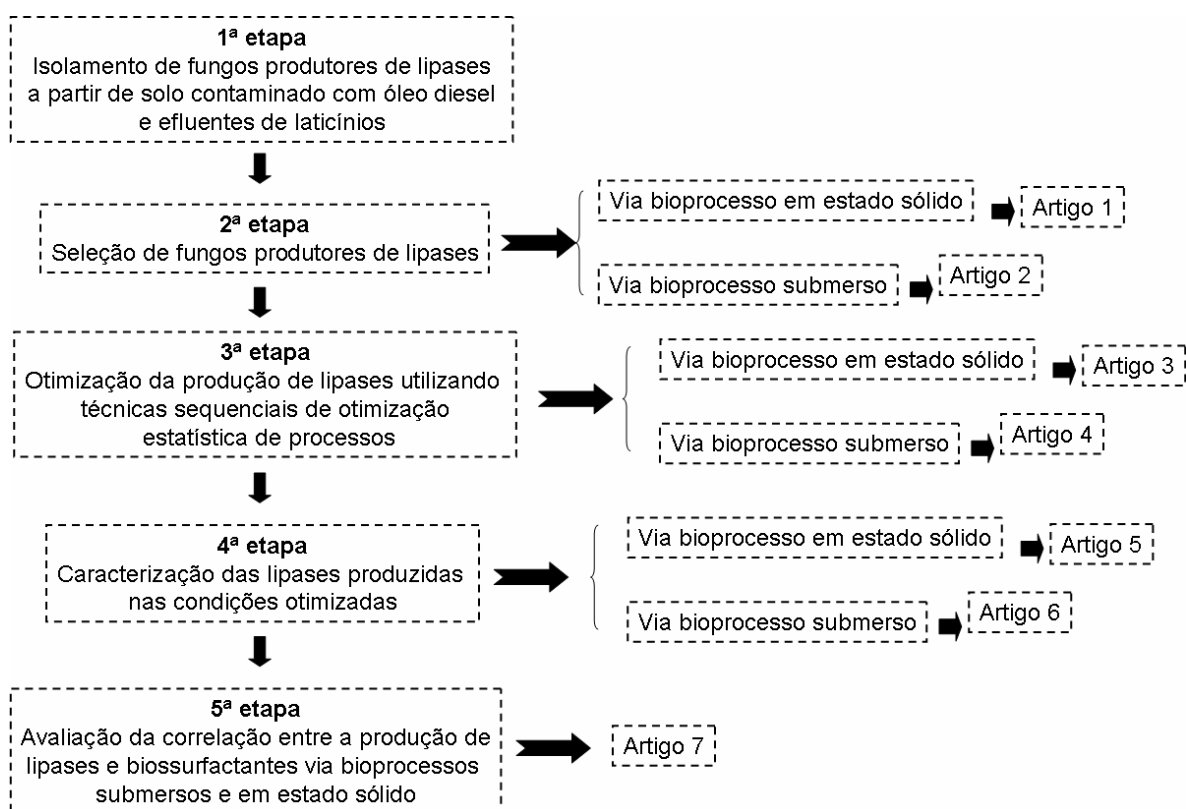
Yang, X.; Wang, B.; Cui, F.; Tan, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2095-2103, 2005.

Yu, J.; Zhang, J.; Zhao, A.; Ma, X. Study of glucose ester synthesis by immobilized lipase from *Candida* sp. **Catalysis Communications**, v. 9, n. 6, p. 1369-1374, 2008.

CAPÍTULO IV: ARTIGOS

4. ARTIGOS

Neste capítulo encontram-se descritos os procedimentos experimentais utilizados no desenvolvimento do trabalho, bem como os resultados obtidos, escritos na forma de artigos científicos. O fluxograma abaixo apresenta um esquema das etapas experimentais realizadas.



Fluxograma explicativo das etapas experimentais realizadas.

4.1. SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE LIPASES ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

4.1.1. RESUMO

*A fermentação em estado sólido foi realizado com farelo de trigo e casca de arroz como substrato a fim de isolar fungos filamentosos com atividade lipolítica a partir de efluente de laticínios e solo contaminado com óleo diesel. A atividade lipolítica foi medida em unidades, sendo uma unidade (U) definida como a quantidade de enzimas requeridas para liberar 1 μmol de ácidos graxos por minuto por grama de substrato úmido ($1\text{ U} = 1\ \mu\text{mol}\ \text{min}^{-1}\ \text{g}^{-1}$). Foram isolados 24 fungos filamentosos com atividade lipolítica, 17 a partir do efluente de laticínios e 7 a partir do solo contaminado com óleo diesel. Os melhores produtores de lipases foram os fungos *Aspergillus* E-6, isolado do efluente de laticínios, com atividade lipolítica máxima de 49,81 U, e *Aspergillus* O-4, isolado do solo contaminado com óleo diesel, com máxima atividade lipolítica de 45,49 U. Ambos fungos apresentaram máximas atividades após oito dias de fermentação.*

Palavras-chave: farelo de trigo, fungos filamentosos e lipases.

4.1.2. ABSTRACT

*A solid-state (SS) bioprocess with wheat bran and rice husk as substrate was used to isolate filamentous fungi with lipase activity from dairy effluent and soil contaminated with diesel oil. Lipase activity was measured in units, with one unit (U) being defined as the amount of enzyme required to liberate 1 μmol of fatty acids per minute per gram of bran substrate ($1\text{ U} = 1\ \mu\text{mol}\ \text{min}^{-1}\ \text{g}^{-1}$). We obtained 24 isolates of filamentous fungi with lipase activity, 17 from the dairy effluent and 7 from the diesel oil-contaminated soil. The best lipase producers were the dairy effluent isolate *Aspergillus* E-6, with a maximum lipase activity of 49.81 U, and *Aspergillus* isolate O-4 recovered from the diesel oil-contaminated soil, with a maximum lipase activity of 45.49 U. Both these isolates produced their maximum lipase activity eight days after the start of the bioprocess.*

Key words: filamentous fungi, lipase, wheat bran.

4.1.3. INTRODUÇÃO

A fermentação em estado sólido (FES) é uma técnica de crescimento de microrganismos na superfície e no interior de partículas porosas úmidas na qual o conteúdo de líquido contido na matriz sólida deve ser mantido em valores de atividade de água que assegure o conveniente crescimento e metabolismo celular, mas que não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz. Devido aos baixos níveis de atividade de água (a_w), os fungos filamentosos são os que recebem a maior atenção, pois apresentam melhor capacidade de crescimento nestas condições (COUTO et al., 2005; PANDEY, 2003; PANDEY et al., 2000). Os fungos filamentosos são os microrganismos de maior importância industrial usados em FES, pois estes podem crescer naturalmente em frutas, grãos e resíduos agrícolas e florestais, sendo as condições de cultivo deste tipo de processo muito próximas às condições naturais de crescimento, com valores de a_w na ordem de 0,70 – 0,80, ideal para o crescimento de muitos fungos, especialmente os filamentosos. Na FES o uso de resíduos agroindustriais como farelos e palha de trigo e arroz, casca de soja, milho e arroz, bagaço de mandioca e de cana-de-açúcar entre outros, são de extrema importância, porque auxiliam na resolução de problemas de poluição ambiental, causados pelo grande volume destes materiais que são gerados pelas indústrias, e ainda torna a fermentação com um custo mais baixo (RAIMBAULT, 1998)

Os fungos filamentosos têm sido estudados como bons produtores de lipases, sendo os gêneros mais citados *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Fusarium* (HAQ et al., 2002; MAHADIK et al., 2002; MAIA et al., 2001; SHARMA et al., 2001).

As lipases (triacilglicerol-acil-hidrolases E.C.3.1.1.3.) são enzimas capazes de hidrolizar ligações éster de substratos insolúveis em água na interface entre o substrato e a água, que catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG) fornecendo diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres (SHARMA et al., 2001). As lipases representam um grupo de biocatalisadores acessíveis e, normalmente de baixo custo e flexíveis quanto a sua especificidade. As lipases podem ser aplicadas na indústria de alimentos (HASAN et al., 2005; SHARMA et al., 2001), como por exemplo, na fabricação de queijos como aceleradoras do processo de cura, bem como na indústria de detergentes (HASAN et al., 2005), no tratamento de efluentes (MENDES e CASTRO, 2005; ROSA et al., 2005; CASTRO et al., 2004), no desenvolvimento de cosméticos e na indústria farmacêutica (ELIBOL e OZER, 2000), na resolução de misturas racêmicas (RAO et al., 1993) dentre outras aplicações.

Objetivou-se o isolamento e seleção de fungos filamentosos para a produção de lipases através de fermentação em estado sólido.

4.1.4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.4.1. Coleta de amostras, isolamento de fungos, identificação e manutenção

As amostras de solo foram coletadas em profundidades de 50 a 100 cm, de uma área contaminada com óleo diesel. As amostras de efluentes ricos em lipídios e ácidos graxos foram coletadas na saída do equalizador e do tanque de aeração de uma indústria de laticínios (ROVEDA et al., 2009), ambos na cidade de Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Os fungos filamentosos foram isolados das amostras de solo através de diluições seriadas em água peptonada (0,1% p/v de peptona; Acumedium Manufacturers, USA) até diluição 10^{-5} . As diluições foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio meio agar-batata-dextrose (ABD - Acumedium Manufacturers) acidificado até pH 3,5 com uma solução de ácido tartárico a 10%. De cada diluição foi retirado 0,1 mL e inoculado sobre a superfície do meio ABD acidificado sólido em placa de Petri, realizando-se o espalhamento com uma alça de Drigalsky. O isolamento dos fungos do efluente de laticínios foi realizado pela inoculação direta de 0,3 mL do efluente sobre a superfície do meio ABD acidificado em placas de Petry. Em ambos os casos, as placas foram incubadas a 30°C por 5 dias e as colônias individuais foram transferidas para tubos de ensaio contendo água peptonada 0,1%. Os microrganismos foram repicados em meio ABD acidificado até o total isolamento das colônias. Os microrganismos isolados foram mantidos em tubos de ensaio com ABD inclinado a 4°C. Os fungos isolados foram identificados quanto ao gênero através da técnica de microcultivos em lâminas, segundo as características morfológicas (RIBEIRO e SOARES, 2000).

4.1.4.2. Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases

Os fungos isolados foram plaqueados em placas de Petri contendo 30 mL de ABD e incubados a 30°C por 5 dias até a esporulação. Após a incubação, 20 mL de água destilada contendo 0,1% (v/v) de Tween 80 (Sigma) foram adicionados em cada placa realizando-se a raspagem dos esporos através de uma alça de Drigalski. Os esporos fúngicos e o micélio foram filtrados em gaze estéril para separação das hifas.

O meio de cultivo para a fermentação em estado sólido foi preparado com 85,7% de farelo de trigo (90 g), 14,3% (15 g) de casca de arroz e 71% (v/p) (75 mL) de solução salina (2 g L^{-1} de KH_2PO_4 , 1 g L^{-1} de MgSO_4 e 10 mL L^{-1} de solução traço, contendo por L: 0,63 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 mg de MnSO_4 , 0,62 mg de ZnSO_4 e água destilada até o volume de 1 L) (BERTOLIN et al., 2001), a fim de fornecer micronutrientes. O meio de cultivo foi autoclavado a 103 kPa por 20 min, corrigido o pH até 6,0 a partir da adição de uma solução

1,5 M de H_2SO_4 e ajustada a umidade até 60% pela adição de água destilada estéril. Azeite de oliva na proporção de 2% foi adicionado como indutor.

Para cada fungo isolado, duas fermentações foram realizadas, sendo adicionados 50 g de meio de cultivo em frascos erlenmeyers de 300 mL e inoculados com 2,5 mL de suspensão de esporos, obtendo-se uma concentração inicial de inóculo no meio de cultivo de $2 \cdot 10^6$ esporos.g⁻¹. Os frascos foram incubados em estufa a 30 °C por 10 dias, sendo realizadas coletas de 10 g de amostras a cada 48 h para a determinação de lipases.

4.1.4.3. Determinação da atividade lipolítica

As lipases foram extraídas dos meios fermentados pela adição de 10 mL de tampão fosfato (0,1 M; pH 7,0) a 1 g de farelo fermentado em erlenmeyers de 250 mL. Os frascos foram submetidos a agitação a 160 min⁻¹ por 30 min a 37°C, posteriormente o líquido foi decantado e filtrado em algodão para a remoção de sólidos suspensos.

A atividade lipolítica foi determinada, em duplicata, através do método proposto por Burkert et al. (2004), o qual se baseia na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase presente no extrato enzimático sobre os triacilgliceróis do azeite de oliva emulsionados em goma arábica.

Em frascos de 250 mL adicionaram-se 2 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0), 5 mL de emulsão preparada com 75 mL de goma arábica a 7% e 25 mL de óleo de oliva. A este sistema adicionou-se 1 mL de extrato enzimático e incubou-se a 37°C durante 30 min. Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de 15 mL de solução acetona:etanol:água (1:1:1) e titularam-se os ácidos graxos liberados com uma solução de NaOH 0,01 M utilizando fenolftaleína como indicador.

Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ_{mol} de ácido graxo por minuto por grama de farelo fermentado úmido (1 U=1 μ_{mol} min⁻¹ g⁻¹), nas condições do ensaio.

4.1.4.4. Análise estatística

A atividade lipolítica em função do tempo foi tabelada e plotada. As máximas atividades lipolíticas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas através do teste de Tukey (BOX et al., 1978).

4.1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.5.1. Isolamento dos fungos, identificação e produção de lipases em função do tempo

Foram isolados 17 fungos filamentosos (fungos E-1, E-3, E-5 a E-10 e E-12 a E-20) do efluente de laticínio e 7 fungos filamentosos do solo contaminado com óleo diesel (fungos O-1 e O-3 a O-8), sendo que todos apresentaram atividade lipolítica.

A atividade lipolítica em função do tempo para os fungos E-1, E-3 a E-10 e E-12 a E-20 está mostrada na Figura 1 e para os fungos O-1 e O-3 a O-8 na Figura 2.

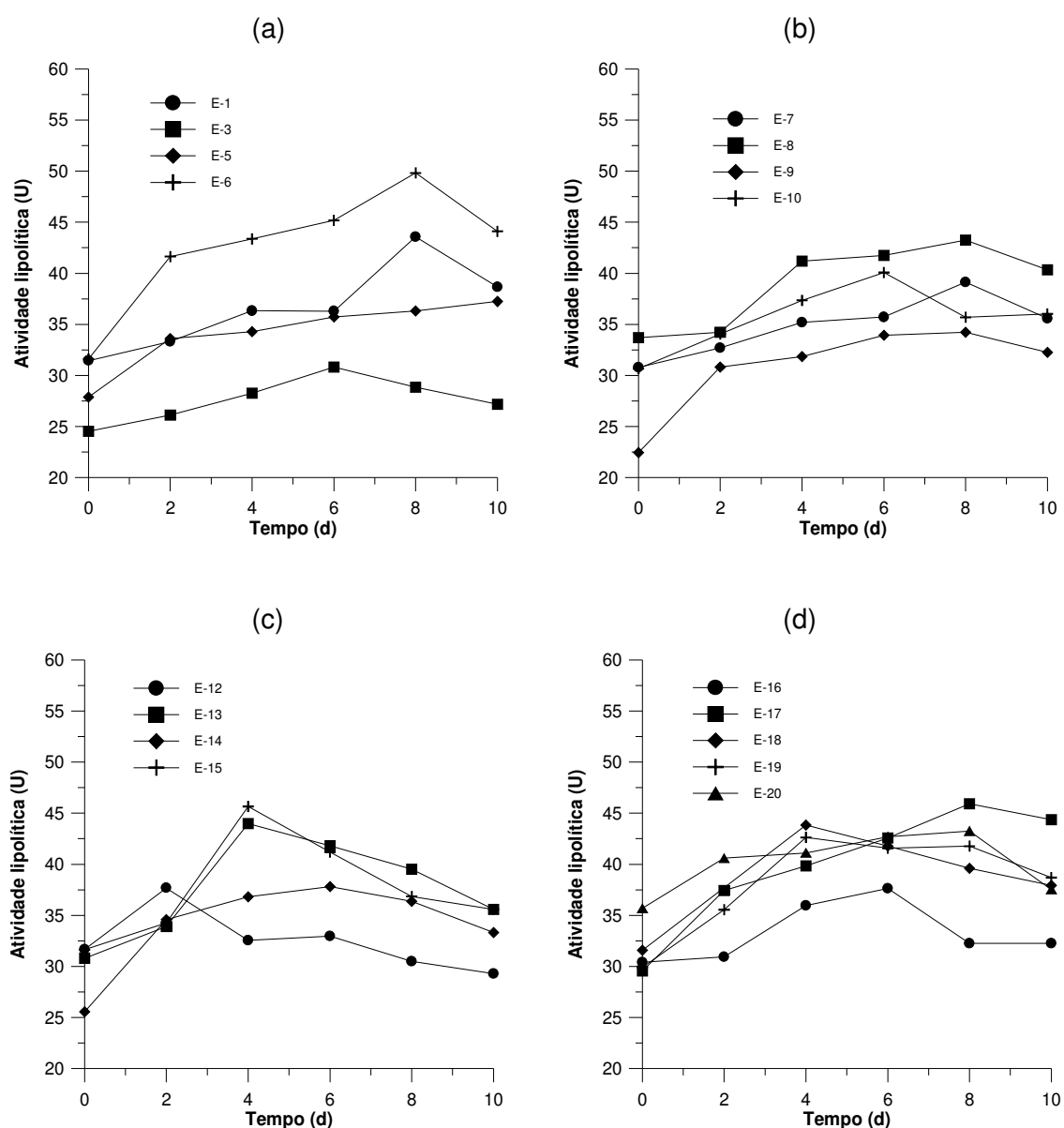


Figura 1 Atividades lipolíticas em função do tempo para (a) fungos E-1, E-3, E-5 e E-6, (b) E-7 a E-10, (c) E-12 a E-15, e (d) E-16 a E-20

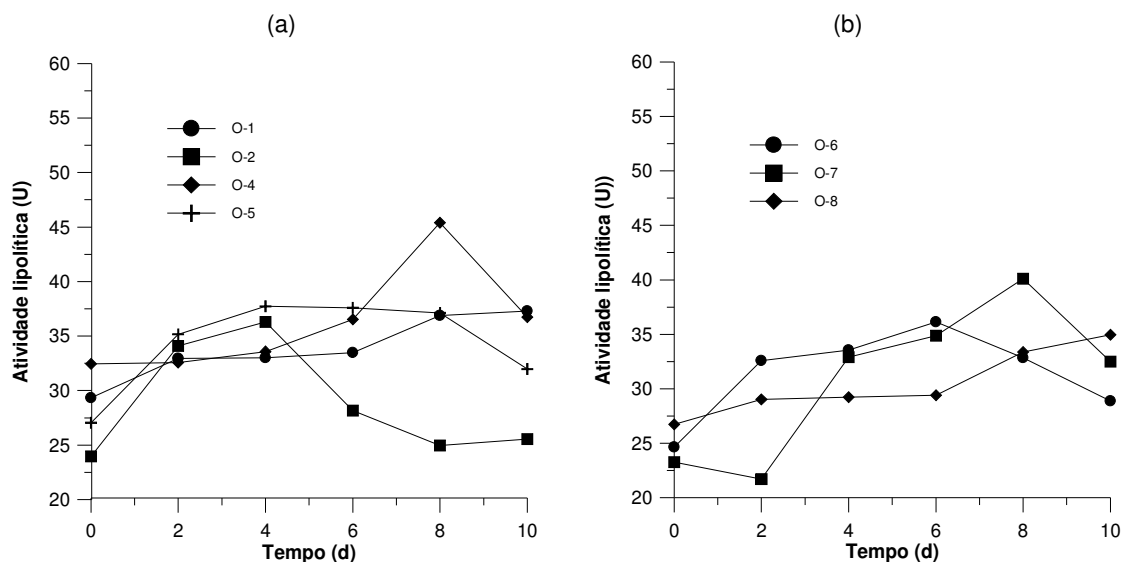


Figura 2 Atividades lipolíticas em função do tempo para (a) fungos O-1, O-3, O-4 e O-5, (b) fungos O-6, O-7 e O-8

As máximas atividades lipolíticas obtidas dentre os fungos isolados do efluente de laticínios foram obtidas no oitavo dia após a inoculação, de 49,81 U para o fungo *Aspergillus* E-6 (Fig. 1a) e 45,92 U para o *Aspergillus* E-17 (Fig. 1d). Os fungos isolados do solo contaminado com óleo diesel também apresentaram as máximas atividades lipolíticas no oitavo dia após a inoculação, sendo as máximas atividades obtidas pelos fungos *Aspergillus* O-4 (45,49 U - Fig. 2a) e *Trichoderma* O-7 (40,09 U - Fig. 2b).

4.1.5.2. Máximas atividades lipolíticas obtidas pelos fungos isolados do efluente de laticínios e do solo contaminado com óleo diesel

A análise de variância (Tabela 1) das máximas atividades lipolíticas (Tabela 2) obtidas pelos fungos apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,01$) entre as cepas isoladas de cada fonte. Os valores F obtidos para as réplicas das fermentações demonstram que não houve diferenças significativas entre as mesmas ($p=0,215$ e $p=0,528$) (Tabela 1) no nível de probabilidade testado, indicando que houve repetibilidade entre as repetições dos experimentos.

Os fungos isolados do efluente de laticínios apresentaram diferenças significativas entre si através da comparação de médias pelo teste de Tukey ($p=0,05$) com relação à máxima atividade lipolítica obtida, sendo que a cepa de *Aspergillus* E-6 apresentou atividade lipolítica significativamente superior ($p < 0,05$) (49,81 U) às outras cepas isoladas do efluente de laticínios (Tabela 2). Os fungos *Aspergillus* E-17 e *Fusarium* E-1 apresentaram as segundas maiores atividades lipolíticas dentre os fungos isolados do efluente de laticínios,

no entanto, sem diferenças estatísticas entre si ($p > 0,05$), sendo as máximas atividades obtidas de 45,92 e 43,56 U, respectivamente. Os fungos E-1, E-8, E-19 e E-20 apresentaram atividades lipolíticas iguais entre si ($p > 0,05$), sendo a máxima atividade obtida dentre estas cepas de 42,95 U. Os demais fungos isolados do efluente de laticínios apresentaram máximas atividades de lipolíticas inferiores a 40 U, sendo a menor atividade obtida pelo fungo *Penicillium* E-3, de 28,84 U (Tabela 2).

Tabela 1 Análise de variância da atividade lipolítica máxima dos fungos isolados de efluente de laticínios ($n = 17$) e de solo contaminado com óleo diesel ($n = 7$)

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | Valor F | p |
|---|--------------------|--------------------|----------------|----------|--------|
| Efluente de laticínios | | | | | |
| Média | 101516,9 | 1 | 101516,9 | 105680,4 | <0,001 |
| Réplicas* | 1,5 | 1 | 1,5 | 1,6 | 0,215 |
| Fungos ($n = 17$) | 2005,1 | 16 | 125,3 | 130,5 | <0,001 |
| Erro | 48,0 | 50 | 1,0 | | |
| Solo contaminado com óleo diesel | | | | | |
| Média | 35402,4 | 1 | 35402,4 | 31887,9 | <0,001 |
| Réplicas* | 0,5 | 1 | 0,5 | 0,4 | 0,528 |
| Fungos ($n = 7$) | 974,8 | 6 | 162,5 | 146,3 | <0,001 |
| Erro | 22,2 | 20 | 1,1 | | |

Os fungos isolados do solo contaminado com óleo diesel também apresentaram diferenças significativas entre si através do teste de Tukey ($p = 0,05$) com respeito às máximas atividades lipolíticas obtidas, sendo que o fungo *Aspergillus* O-4 apresentou atividade significativamente superior ($p < 0,05$) aos demais fungos isolados do solo (45,49 U). O fungo *Trichoderma* O-7 apresentou a segunda maior atividade lipolítica (40,09 U) deste grupo, significativamente superior ($p < 0,05$) aos demais fungos (O-1, O-5, O-8 e O-6), os quais apresentaram máximas atividades lipolíticas de 32,85 a 36,88 U (Tabela 2). A menor atividade lipolítica (24,96 U) foi obtida pelo fungo *Penicillium* O-3 (Tabela 2).

A maioria dos estudos de produção de lipases por bactérias, fungos e leveduras têm sido realizados em fermentação submersa. Todavia, há poucos relatos da síntese de lipases em fermentação em estado sólido. Recentemente, crescente atenção tem sido dada à conversão de resíduos industriais em lipases via fermentação em estado sólido (COUTO et al., 2005), demonstrando a importância do isolamento de cepas de microrganismos produtores de lipases via fermentação em estado sólido, em especial fungos filamentosos,

os quais são considerados os microrganismos que mais se adaptam às condições deste processo (PANDEY, 2003; PANDEY et al., 2000; RAIMBAULT, 1998).

Tabela 2 Atividade lipolítica máxima \pm desvio padrão (DP) dos fungos isolados de efluentes de laticínios (E) e solo contaminado com óleo diesel (O)

| Atividade lipolítica máxima (U) dos fungos filamentosos isolados de diferentes fontes | | | |
|--|--------------------------------|---|--------------------------------|
| Efluente de laticínios | | Solo contaminado com óleo diesel | |
| Fungo | AL* | Fungo | AL* |
| E-6 <i>Aspergillus</i> | 49,81 \pm 0,75 ^a | O-4 <i>Aspergillus</i> | 45,49 \pm 0,69 ^a |
| E-17 <i>Aspergillus</i> | 45,92 \pm 1,14 ^b | O-7 <i>Trichoderma</i> | 40,09 \pm 0,34 ^b |
| E-1 <i>Fusarium</i> | 43,56 \pm 0,60 ^{bc} | O-1 <i>Aspergillus</i> | 36,88 \pm 0,67 ^c |
| E-8 <i>Aspergillus</i> | 43,26 \pm 0,92 ^c | O-5 <i>Aspergillus</i> | 35,37 \pm 2,48 ^{cd} |
| E-20 <i>Penicillium</i> | 43,25 \pm 1,55 ^c | O-8 <i>Aspergillus</i> | 33,37 \pm 0,67 ^{de} |
| E-19 <i>Trichoderma</i> | 41,76 \pm 0,11 ^{cd} | O-6 <i>Penicillium</i> | 32,85 \pm 0,34 ^e |
| E-18 <i>Trichoderma</i> | 39,60 \pm 0,68 ^{de} | O-3 <i>Penicillium</i> | 24,96 \pm 0,69 ^f |
| E-13 <i>Trichoderma</i> | 39,52 \pm 0,89 ^{de} | | |
| E-7 <i>Aspergillus</i> | 39,12 \pm 0,10 ^{ef} | | |
| E-15 <i>Aspergillus</i> | 36,84 \pm 0,55 ^{fg} | | |
| E-14 <i>Fusarium</i> | 36,37 \pm 0,12 ^{gh} | | |
| E-5 <i>Fusarium</i> | 36,32 \pm 0,66 ^{gh} | | |
| E-10 <i>Aspergillus</i> | 35,69 \pm 0,93 ^{gh} | | |
| E-9 <i>Aspergillus</i> | 34,23 \pm 0,52 ^{hi} | | |
| E-16 NI | 32,25 \pm 0,03 ^{ij} | | |
| E-12 <i>Penicillium</i> | 30,51 \pm 1,88 ^{jl} | | |
| E-3 <i>Penicillium</i> | 28,84 \pm 0,94 ^l | | |

*Em cada coluna, medias seguidas de letras iguais não apresentam diferenças significativas entre si através do teste de Tukey a 5% de significância ($p > 0,05$). * AL=atividade lipolítica (média \pm desvio padrão)

Os fungos são considerados bons produtores de enzimas (MAIA et al., 2001) e as lipases fúngicas são preferidas para a aplicação industrial, principalmente na indústria de alimentos (MAHADIK et al., 2002). Sharma et al. (2001) cita inúmeras cepas de fungos como boas produtoras de lipases, incluindo os gêneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor* e *Rhizopus*.

D'Annibale et al. (2006), utilizando fungos e leveduras (fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Rhizopus* e leveduras do gênero *Candida*) em cultivos

submersos com efluentes de indústria de azeite de oliva como substrato encontraram que as máximas atividades lipolíticas foram obtidas pela levedura *Candida cylindracea* cepa NRRL Y-17506 (0,6 UI mL⁻¹) e pelo fungo *Geotrichum candidum* NRRL Y-553 (0,52 UI mL⁻¹). A produtividade máxima foi produzida pelo fungo *Penicillium citrinum*, cepas ISRIM 118 (5,42 UI L⁻¹ h⁻¹) e NRRL 3754 (4,58 UI L⁻¹ h⁻¹).

Os melhores produtores de lipases obtidos neste estudo foram fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, cepa E-6, isolada do efluente de laticínios (49,81 U) e cepa O-4, isolada do solo contaminado com óleo diesel (45,49 U). Os fungos deste gênero têm sido relatados por inúmeros pesquisadores como sendo bons produtores de lipases. Por exemplo, Mahadik et al. (2002) estudaram a capacidade de formação de butil-ésteres a partir de óleo de manteiga em fermentação submersa pelos microrganismos *Rhizopus*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Penicillium* e *Aspergillus*, sendo os melhores resultados obtidos pelos fungos *R. arrhizus* e *A. niger*. O *A. niger* apresentou maior produção de lipases extracelulares, sendo utilizado posteriormente pelos autores para a produção de lipases em fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como componente principal do meio de cultivo. O *A. niger* também foi utilizado por Falony et al. (2006) e por Damaso et al. (2005) para a produção de lipases via fermentação em estado sólido, sendo que ambos os estudos utilizaram farelo de trigo como componente do meio de cultivo. Montesino et al. (2005) utilizou o *A. niger* para a degradação de resíduos líquidos ricos em gordura.

Haq et al. (2002) estudaram a produção de lipases pelos fungos *R. oryzae*, *M. lipolytica*, *R. oligosporous*, *A. niger*, *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*, *R. nigrican*, *R. arrhizum* e *A. wentti*, via fermentação em estado sólido. Embora tenha havido a produção de lipases pelo *A. wentti*, os melhores resultados na etapa de seleção foi obtido pelo *R. oligosporous*, crescendo em meio composto por farelo de trigo a 30°C.

Inúmeros trabalhos também relatam a produção de lipases por fungos do gênero *Penicillium*, como por exemplo, Gombert et al. (1999) que reportaram que o *Penicillium restrictum* foi um bom produtor de lipases via fermentação submersa, e D'Annibale et al. (2006), que relataram que crescendo em efluente de azeite de oliva as máximas atividades lipolíticas por unidade de volume foram obtidas para o *P. citrinum*. Todavia, no presente trabalho, somente o fungo *Penicillium* E-20 apresentou atividade lipolítica elevada, enquanto que as demais cepas de *Penicillium* isoladas apresentaram baixas atividades lipolíticas comparadas com os outros gêneros de fungos, independente da fonte da qual foram isolados (Tabela 2).

Leal et al. (2002) utilizaram o fungo *Penicillium restrictum* para a produção de um extrato enzimático rico em lipases através de fermentação em estado sólido usando torta de babassu como substrato. O extrato enzimático foi utilizado para a hidrólise de um efluente de laticínios contendo elevados conteúdos de gordura (de 180 a 1.200 mg L⁻¹). O efluente

hidrolisado foi posteriormente submetido ao tratamento biológico anaeróbico, sendo que houve um aumento na eficiência do tratamento anaeróbico nas amostras previamente hidrolisadas. Este mesmo microrganismo foi utilizado por Rosa et al. (2006) em estudo semelhante, onde o farelo fermentado em FES, rico em lipases, foi utilizado para o tratamento de um efluente semi-sintético contendo gordura de leite em sistema de lodos ativados, tendo sido demonstrado que o pré-tratamento enzimático de efluentes é uma boa alternativa em sistema de lodos ativados operando sob regime contínuo. A exemplo destes trabalhos, os fungos isolados do efluente da indústria de laticínios poderão ser utilizados para a elaboração de um farelo fermentado a ser utilizado no tratamento deste efluente, sendo que a possibilidade de eficiência do tratamento é alta, visto os microrganismos terem sido isolados do próprio efluente, estando portanto, adaptados ao mesmo.

Os fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* foram isolados dos locais de coleta e testados quanto à produção de lipases. Duas cepas de *Trichoderma* foram isoladas do efluente de laticínios e uma cepa do solo contaminado com óleo, tendo apresentado elevadas atividades lipolíticas, em torno de 40 U, entretanto menores que as atividades obtidas pelas cepas de *Aspergillus*, com atividades lipolíticas de 45 a 49 U. Não foram encontrados relatos na literatura da produção de lipases por cepas de *Trichoderma*. Já os fungos do gênero *Fusarium* têm se mostrado bons produtores, entre estes a cepa de *Fusarium solani*, como demonstrado por Maia et al. (2001).

Os fungos O-4 e E-6, ambos do gênero *Aspergillus*, foram os que apresentaram os melhores resultados de produção de lipases em fermentação em estado sólido, de 49,81 e 45,39 U, respectivamente, devendo ser utilizados posteriormente para a seleção de variáveis significativas no processo e otimização da produção de lipases.

4.1.6. CONCLUSÃO

Dos 7 fungos isolados de solo contaminado com óleo diesel e 17 fungos isolados de efluente de indústria de laticínios, 2 foram selecionados como promissores produtores de lipases por fermentação em estado sólido, um isolado de solo contaminado com óleo diesel (*Aspergillus* O-4) e um isolado de efluente de laticínios (*Aspergillus* E-6).

Agradecimentos: ao CNPq pelo apoio financeiro.

4.1.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bertolin et al., T.E.; Costa, J.A.V.; Pasquali, G.D.L. Glucoamylase production in batch and fed-batch solid state fermentation: effect of maltose or starch addition. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 13-16, 2001.

Box, G.E.P.; Hunter, W.G.; Hunter, J.S. Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. Wiley & Sons, New York, USA, 1978.

Burkert, J.F.M.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 77-84, 2004.

Castro, H.F.; Mendes, A.A.; Santos, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química nova**, v. 27, n. 1, p. 146 – 156, 2004.

Couto, S.R.; Sanromán, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. **J. Food Eng.**, v. 76, p. 291-302, 2006.

Damaso, M.C.T.; Couri, S.; Passianoto, M.A.; Freitas, S.C. Produção de lipases por fermentação semi-sólida tendo como indutores da síntese, subprodutos do refino do óleo de milho. In **Proceedings of XV Sinaferm** - Simpósio Nacional de Fermentações, Recife, Brazil, pp. 1-7, 2005.

D'Annibale, A.; Sermanni, G.G.; Federici, F.; Petruccioli, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Biores. Technol.**, v. 97, p. 1828-1833, 2006.

Elibol, M.; Ozer, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rizopus arhizus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 325-329, 2000.

Falony, G.; Armas, J.C.; Mendonza, J.C.D.; Hernández, J.L.M. Production of extracellular lipases from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 44, p. 235–240, 2006.

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.

Hasan, F.; Shah, A.A.; Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 39, p. 235-251, 2006.

Haq, I.; Idrees, S.; Rajoka, M.I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 637-341, 2002.

Leal, M.C.M.R.; Cammarota, M.C.; Freire, D.M.G.; Sant'Anna Jr., G.L. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 175-180, 2002.

Mahadik, N.D.; Puntambekar, U.S.; Bastawde, K.B.; Khire, J.M.; Gokhale, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.

Maia, M.M.D.; Heasley, A.; Camargo de Moraes, M.M.; Melo, E.H.M.; Moraes 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, p. 23-27, 2001.

Mendes, A.A; Castro, H.F.. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química nova**, v.28, n. 2, p. 296 – 305, 2005.

Montesino, A.I.L.; Armas, J.C.; Marrero, M.D.; Mendonza, J.C.D. Estudio de la degradacion enzimatica de residuales liquidos ricos en grasas y aceites. In Proceedings of XV Sinaferm - **Simpósio Nacional de Fermentações**, Recife, Brazil. pp. 1-6, 2005.

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

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

Raimbault, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 174-188, 1998.

Rao, P.V.; Jayaraman, K.; Laksahmanan, C.M. Production of lipase by *Candida rugosa* in solid state fermentation. 1: Determination of significant process variables. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 669-78, 1993.

Ribeiro, M.C.; Soares, M.M. **Microbiologia Prática: Roteiro e Manual, Bactérias e Fungos**. 1ª. ed. Atheneu, Rio de Janeiro, p. 112, 2000.

Rosa, D.R.; Cammarota, M.C.; Freire, D.M.G. Production and utilization of a novel solid enzymatic preparation produced by *Penicillium resctrictum* in activated sludge systems treating wastewater with high levels of oil and grease. **Environ. Eng. Sci.**, v. 23, p. 814-823, 2006.

Roveda, M.; Colla, L.M.; Hemkemeier, M. Produção de lipases por microrganismos isolados de efluentes de laticínios através de fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, aceito para publicação, 2009.

Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, Y. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

4.2. SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA

4.2.1. RESUMO

*As lipases são enzimas que apresentam aplicações em diversos setores industriais, como as indústrias alimentícias, farmacêutica e de síntese química. A seleção de microrganismos isolados de efluentes ou solos é uma alternativa para a descoberta de novas espécies com elevadas produtividades em enzimas com atividades catalíticas diferenciadas. Neste trabalho, a seleção de fungos lipolíticos foi realizada através de fermentação submersa. Um total de 27 fungos, 20 isolados de efluente de laticínios e 7 isolados de solo contaminado com óleo diesel, foram utilizados. Os maiores produtores foram os fungos *Penicillium E-3*, com máxima atividade lipolítica de 2,81 U, *Trichoderma E-19* e *Aspergillus O-8*, com máximas atividades de 2,34 e 2,03 U. Todos os fungos apresentaram as máximas atividades lipolíticas em 4 dias de fermentação.*

Palavras-chave: fermentação submersa, fungos filamentosos, lipases.

4.2.2. ABSTRACT

*Lipases are enzymes which present many applications in several sectors, as food, pharmaceutical and chemical synthesis industries. The selection of microorganisms isolated from dairy effluents or soil to production of enzymes is a goal for discovering new strains which can present higher productivities and enzymes with different catalytic properties. In this work, the selection of lipolytic fungi was carried out using a submerged bioprocess. A total of 27 fungi, 20 isolated from the dairy effluent and 7 isolated from the diesel oil-contaminated soil were used. The major lipase producers were the isolate *Penicillium E-3*, with a maximum lipase activity of 2.81 U, *Trichoderma E-19* and *Aspergillus isolate O-8* with a maximum lipase activity of 2.34 and 2.03 U. All isolates produced their maximum lipase activity 4 days after the start of the bioprocess.*

Key words: filamentous fungi, lipase, screening and submerged fermentation

4.2.3. INTRODUÇÃO

As lipases (triacilglicerol-acil-hidrolases E.C.3.1.1.3.) são enzimas capazes de hidrolizar ligações éster de substratos insolúveis em água na interface entre o substrato e a

água, que catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis (TAG) fornecendo diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG), glicerol e ácidos graxos livres (SHARMA et al., 2001). As lipases podem ser aplicadas na indústria de detergentes (HASAN et al., 2006), no tratamento de efluentes (MENDES e CASTRO, 2005; ROSA et al., 2006; CASTRO et al., 2004), para o desenvolvimento de cosméticos, compondo medicamentos (enzimas digestivas) ou como reagentes clínicos (ELIBOL e OZER, 2000) e na resolução de misturas racêmicas (RAO et al., 1993). Na indústria de alimentos apresentam aplicações na síntese emulsificantes (KIM et al., 2006), no aumento dos teores de ácidos graxos insaturados em lipídios (CARVALHO et al., 2003), na produção de margarinas, no desenvolvimento de aromas (LARIOS et al., 2004), na maturação de queijos (DUPUIS et al., 1993), entre outros.

Os microrganismos representam uma fonte comercialmente vantajosa de produção de enzimas, em particular lipases. Conseqüentemente, a seleção de novos microrganismos que produzam com eficiência estas enzimas e estudos sobre a regulação biossintética destes metabólitos são muito importantes (MAKHSUMKHANOV et al., 2003).

As lipases fúngicas são preferidas para aplicação industrial, principalmente na indústria de alimentos (MAHADIK et al., 2002). Os gêneros de fungos mais citados como produtores de lipases são *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Fusarium* (D'ANIBALLE et al., 2005; HAQ et al., 2002; MAHADIK et al., 2002; MAIA et al., 2001).

A seleção de fungos lipolíticos de solos é uma área nova e de interesse de pesquisadores devido ao potencial existente na microflora deste ambiente (SHUKLA e GUPTA, 2007). Além disso, observa-se que as condições ambientais presentes em solos, muitas vezes decorrentes de processos de acumulação de compostos tóxicos, ocasionam a seleção natural de microrganismos, os quais produzem determinados metabólitos celulares necessários à sua adaptação e sobrevivência.

Outra fonte potencial de microrganismos produtores de lipases são os efluentes industriais ricos em lipídios (ERTUGRUL et al., 2007; D'ANIBALLE et al., 2005), visto desenvolverem esta capacidade metabólica a fim de se manterem vivos no efluente, realizando o tratamento destes resíduos, como relatado por Matsumiya et al. (2007), que demonstraram o tratamento de um efluente rico em lipídios através do uso de lipases produzidas por um microrganismo isolado do próprio efluente.

A seleção de microrganismos produtores de lipases geralmente inicia a partir do crescimento destes em placas contendo ágar adicionado de uma fonte lipídica, conforme relatado por diversos autores (ROVEDA et al., 2009; SHUKLA e GUPTA, 2007; COLEN et al., 2006). Entretanto, a dificuldade na seleção de fungos lipolíticos por estes métodos está relacionada ao crescimento excessivo, às baixas atividades lipolíticas e à interferência dos metabólitos fúngicos (COLEN et al., 2006). Além disso, microrganismos selecionados através deste método nem sempre se apresentam como bons produtores de lipases nas

condições oferecidas nas fermentações em estado sólido ou submersas. Assim, o objetivo deste trabalho foi a seleção de fungos produtores de lipases utilizando fermentação submersa.

4.2.4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.4.1. Microrganismos e manutenção

Os fungos utilizados neste estudo foram isolados de solo contaminado com óleo diesel e de efluentes de laticínios por Colla et al. (2009), sendo mantidos a 4°C em tubos com ABD (ágar-dextrose-batata).

4.2.4.2. Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases

O preparo do inóculo foi realizado através da inoculação dos fungos em placas de Petri contendo 30 mL de meio ABD solidificado e incubação a 30°C por 5 dias. Após o crescimento, foi preparada uma suspensão de esporos através da adição de 20 mL de uma solução de Tween 0,1% (v/v) seguida de raspagem dos esporos com uma alça de Drigalsky e filtração em gaze estéril para retenção das hifas.

O meio de cultivo foi preparado utilizando-se 10% (p/v) de farelo de trigo, o qual foi submetido a cozimento a 100°C durante 30 min em 50% do volume total de água destilada. Após, o meio foi filtrado e o extrato solúvel adicionado de 10% (v/v) de solução salina, 1% (p/v) de nitrato de sódio e 1% (p/v) de azeite de oliva como indutor para a produção de lipases. A solução salina continha 2 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 1 g L⁻¹ de MgSO₄ e 10 mL L⁻¹ de solução traço, a qual era composta por 0,63 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O, 0,01 mg L⁻¹ de MnSO₄ e 0,62 mg L⁻¹ de ZnSO₄ (BERTOLIN et al., 2001). O meio líquido foi autoclavado e o pH do meio ajustado para 6,0 utilizando-se soluções de HCl 1,5 M ou NaOH 1 M.

Para cada microrganismo utilizado na seleção, duas fermentações foram realizadas adicionando-se 100 mL do meio líquido foram adicionados em erlenmeyers de 125 mL e inoculando-se com 5 mL da suspensão de esporos, com posterior incubação a 30°C durante 10 dias, sendo retiradas amostras a cada 24 h para a determinação das atividade lipolítica.

4.2.4.3. Determinação da atividade lipolítica

As amostras foram filtradas em algodão para a remoção das hifas e os filtrados utilizados para a determinação da atividade lipolítica.

A atividade enzimática foi determinada através do método padronizado por Burkert et al. (2004), o qual baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase presente no extrato enzimático sobre os triacilgliceróis do azeite de oliva emulsionados em goma arábica.

Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto por mL de extrato enzimático ($1\text{U} = 1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$), nas condições do ensaio.

4.2.4.4. Análise estatística

Os resultados de atividade lipolítica máxima foram analisados através de Análise de Variância (Anova) e teste de Tukey para comparação de médias (BOX et al., 1978).

4.2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 27 fungos utilizados para a produção de lipases em fermentação submersa, bem como as máximas atividades lipolíticas obtidas, estão apresentados na Tabela 1. Os fungos que apresentaram as maiores atividades lipolíticas médias entre as réplicas das fermentações foram os fungos E-3, O-8, E-20, E-5, E-16, O-4 e E-19, pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Trichoderma*, os quais levaram a atividades lipolíticas médias superiores a 1,29 U. Dos fungos isolados, somente as cepas O-8 e O-4 foram isoladas de solo contaminado com óleo diesel, sendo as demais cepas isoladas de efluente de laticínio. Segundo Sharma et al. (2001), dentre os fungos produtores de lipases, os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* encontram-se como os melhores produtores, o que está de acordo com o encontrado neste trabalho.

A análise de variância dos dados de atividade enzimática (Tabela 1) demonstrou haver diferença significativa entre os fungos ($p < 0,01$) quanto à produção de lipases em meio líquido contendo farelo de trigo e azeite de oliva como fontes de carbono. Entretanto, houve diferença significativa entre as réplicas das fermentações ($p < 0,01$). Devido a isto, os fungos que apresentaram as maiores atividades lipolíticas médias (E-3, O-8, E-20, E-5, E-16 e E-19) foram utilizados em uma segunda etapa de seleção. O fungo E-19 foi escolhido em detrimento do fungo O-4 em virtude deste ter apresentado maior valor de atividade lipolítica em uma das réplicas (1,69 U). Além disso, os fungos E-19 e O-4 não apresentaram diferenças significativas entre si no teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 1 Atividades lipolíticas máximas produzidas pelos fungos utilizados na fermentação submersa

| Fungo | Gênero | Atividade lipolítica (U) |
|-------|--------------------|-------------------------------|
| E-3 | <i>Penicillium</i> | 2,05 ± 0,21 ^a |
| O-8 | <i>Aspergillus</i> | 1,89 ± 0,41 ^{ab} |
| E-20 | <i>Penicillium</i> | 1,78 ± 1,26 ^{abc} |
| E-5 | <i>Fusarium</i> | 1,61 ± 1,68 ^{abcd} |
| E-16 | Não identificado | 1,61 ± 0,12 ^{abcd} |
| O-4 | <i>Aspergillus</i> | 1,38 ± 0,11 ^{abcde} |
| E-19 | <i>Trichoderma</i> | 1,29 ± 0,51 ^{abcde} |
| O-2 | Não identificado | 1,23 ± 0,06 ^{abcdef} |
| E-6 | <i>Aspergillus</i> | 1,23 ± 0,00 ^{abcdef} |
| O-3 | <i>Penicillium</i> | 1,19 ± 0,05 ^{abcdef} |
| E-8 | <i>Aspergillus</i> | 1,19 ± 0,06 ^{abcdef} |
| E-18 | <i>Trichoderma</i> | 1,16 ± 0,15 ^{bcdef} |
| O-6 | <i>Penicillium</i> | 1,14 ± 0,01 ^{bcdef} |
| O-1 | <i>Aspergillus</i> | 1,13 ± 0,08 ^{bcdef} |
| E-11 | Não identificado | 0,93 ± 0,06 ^{cdef} |
| E-10 | <i>Aspergillus</i> | 0,93 ± 0,24 ^{cdef} |
| E-1 | <i>Fusarium</i> | 0,85 ± 0,48 ^{def} |
| E-13 | <i>Trichoderma</i> | 0,81 ± 0,26 ^{def} |
| E-2 | Não identificado | 0,72 ± 0,06 ^{ef} |
| E-4 | Não identificado | 0,68 ± 0,12 ^{ef} |
| E-9 | <i>Aspergillus</i> | 0,63 ± 0,18 ^{ef} |
| E-17 | <i>Aspergillus</i> | 0,61 ± 0,11 ^{ef} |
| E-7 | <i>Aspergillus</i> | 0,58 ± 0,06 ^{ef} |
| E-21 | <i>Aspergillus</i> | 0,57 ± 0,32 ^{ef} |
| O-5 | <i>Aspergillus</i> | 0,54 ± 0,00 ^{ef} |
| E-12 | <i>Penicillium</i> | 0,40 ± 0,15 ^f |
| E-14 | <i>Fusarium</i> | 0,38 ± 0,18 ^f |

*Média ± desvio-padrão. Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferença significativa através do teste de Tukey a um nível de significância de 0,05

A Figura 1 apresenta a atividade lipolítica versus tempo para os fungos E-3, E-5 (Figura 1a), E-16 e E-19 (Figura 1b) e E-20 e O-8 (Figura 1c), onde se verifica que as máximas atividades lipolíticas foram, em média, obtidas no tempo de 4 d de fermentação submersa. A análise de variância dos dados de atividade lipolítica máxima na segunda

etapa de seleção demonstrou haver diferença significativa entre os seis fungos testados ($p < 0,01$). O valor F para as réplicas das fermentações não foi significativo ($p = 0,888$) no intervalo de confiança testado, indicando repetibilidade entre as réplicas das fermentações nesta segunda etapa.

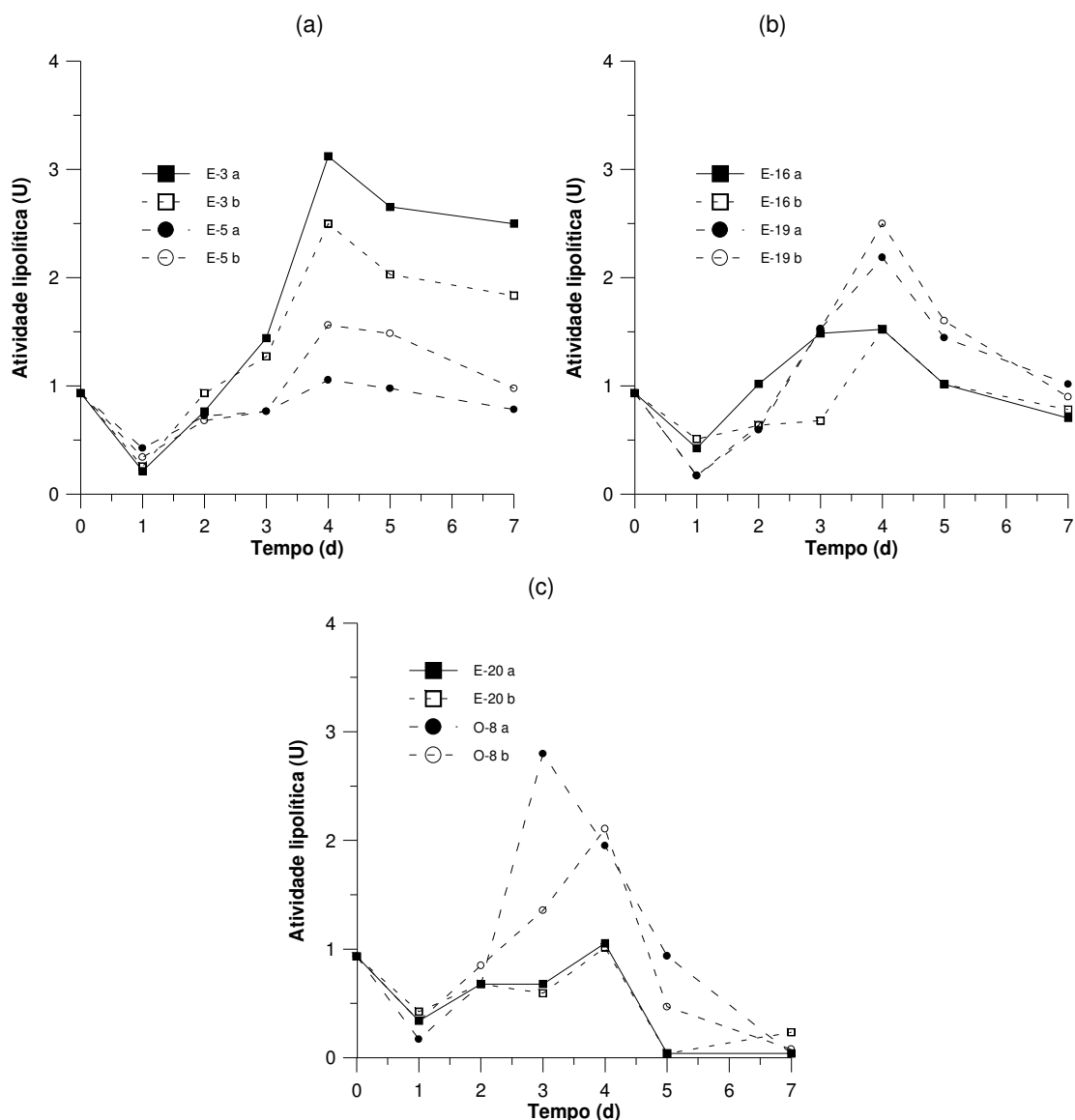


Figura 1 Atividades lipolíticas versus tempo para os fungos (a) E-3, E-5; (b) E-16 e E-19; (c) E-20 e O-8

A Tabela 2 apresenta os resultados de atividade lipolítica máxima para os seis fungos utilizados na segunda etapa de seleção, onde se verifica que o fungo E-3 apresentou a maior atividade lipolítica, similarmente ao que ocorreu na primeira etapa. Entretanto, a atividade lipolítica obtida foi significativamente igual à obtida pelo fungo E-19 ($p = 0,076$), mas superior ($p < 0,05$) as atividades dos demais fungos. Os fungos E-19 e O-8 apresentaram as

segunda e terceira maiores atividades lipolíticas, significativamente superiores que os demais fungos ($p < 0,05$), mas iguais entre si ($p = 0,390$).

Tabela 2 Atividades lipolíticas máximas obtidas pelos fungos utilizados na segunda etapa de seleção de fungos produtores de lipases via fermentação submersa

| Fungo e gênero | Atividade lipolítica (U)* |
|-------------------------|---------------------------|
| E-3 <i>Penicillium</i> | 2,81 ± 0,36 ^a |
| E-19 <i>Trichoderma</i> | 2,34 ± 0,18 ^{ab} |
| O-8 <i>Aspergillus</i> | 2,03 ± 0,13 ^b |
| E-16 Não identificado | 1,52 ± 0,10 ^c |
| E-5 <i>Fusarium</i> | 1,31 ± 0,29 ^c |
| E-20 <i>Penicillium</i> | 1,03 ± 0,07 ^c |

*Média ± desvio-padrão. Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferença significativa através do teste de Tukey a um nível de significância de 0,05

A seleção de microrganismos produtores de lipases tem sido realizada por diversos autores (SHUKLA e GUPTA, 2007), os quais citam uma etapa de pré-seleção em placas de Petri contendo meios sólidos. Estes meios permitem a verificação da produção extracelular de lipases pela formação de um halo transparente no entorno das colônias de microrganismos. Em etapas subsequentes, os microrganismos que apresentam resultados positivos de formação de halo, são utilizados para a seleção propriamente dita através de fermentações submersa ou em estado sólido. No presente trabalho, a seleção dos microrganismos foi realizada diretamente via fermentação submersa, sem a etapa de pré-seleção em placas de Petri contendo meios semi-sólidos, o que consiste numa vantagem, uma vez que as condições de cultivo no meio semi-sólido são muito diferentes das condições oferecidas pela fermentação submersa, principalmente em termos de acesso do microrganismo aos nutrientes e condições de oxigenação.

O azeite de oliva foi utilizado como indutor para a produção de enzimas pelos fungos devido ao fato de ter apresentado os melhores resultados em trabalhos relatados por inúmeros autores (TENG e XU, 2008; WANG et al., 2008; ERTUGRUL et al., 2007; JOSHI et al., 2006; MURALIDHAR et al., 2001; MIRANDA et al., 1997).

O microrganismo que apresentou a maior produção de lipases foi uma cepa do gênero *Penicillium*, isolada de efluente da indústria de laticínios (cepa E-3, 2,81 U). Há vários relatos na literatura com relação à produção de lipases por cepas de *Penicillium*. Gombert et al. (1999) reportaram que o *Penicillium restrictum* foi um bom produtor de lipases

em fermentação submersa. Ainda, D'Annibale *et al.* (2006) relataram que cepas de *P. citrinum* apresentaram máximo crescimento em efluente da indústria de azeite de oliva.

O segundo maior produtor de lipases foi uma cepa de *Trichoderma* (E-19, 2,34 U). Entretanto, este gênero de fungo não tem sido relacionado na literatura com a produção de lipases, mas sim de outras enzimas como as celulases. Quando cepas de *Trichoderma* (E-13, E-18 e E-19) foram testadas para a produção de lipases em fermentação em estado sólido por Colla *et al.* (2009), apresentaram boas produtividades.

A cepa O-8, identificada como *Aspergillus*, apresentou máxima atividade lipolítica de 2,03 U, sendo este gênero reconhecido como bom produtor de lipases, como reportado por Kaushik *et al.* (2006), Mahadik *et al.* (2004), Gulati *et al.* (2000) e Pokorny *et al.* (1997).

Roveda *et al.* (2009) utilizaram os fungos isolados de efluente de laticínios para uma pré-seleção em ágar-batata-dextrose adicionado de 5% de azeite de oliva e avaliaram o crescimento radial dos fungos durante a incubação a 30°C durante 7 d. Os melhores resultados de velocidade de crescimento radial foram obtidos com o fungo E-6 (1,77 cm d⁻¹). Os fungos E-19 e E-3, que apresentaram elevadas atividades lipolíticas no presente trabalho, apresentaram velocidades de crescimento radial muito inferiores, de 0,39 e 0,08 cm d⁻¹. Colla *et al.* (2009) selecionaram estes fungos para a produção de lipases via fermentação em estado sólido e os melhores resultados foram obtidos pelos fungos O-4 e E-6. O fungo E-3, que apresentou a maior atividade lipolítica neste trabalho, foi o que apresentou o menor resultado dentre os fungos isolados do efluente de laticínios na fermentação em estado sólido. Estes resultados demonstram que a habilidade de crescimento em ABD adicionado de azeite de oliva apresentou resultados semelhantes aos obtidos na seleção destes fungos quanto à produção de lipases em fermentação em estado sólido, entretanto, estes fungos não apresentaram bons resultados na seleção através da fermentação submersa.

O método de seleção de fungos produtores de lipases utilizado neste trabalho, via cultivo em processo submerso, possibilita que a seleção seja realizada nas condições reais dos processos fermentativos submersos, o que não ocorre nos processos de seleção que utilizam o crescimento em placas de Petri.

4.2.6. CONCLUSÃO

A seleção de fungos produtores de lipases tem sido realizada através de variadas metodologias. O método utilizado para a seleção de fungos lipolíticos, através da fermentação submersa, apresentou resultados confiáveis, por serem utilizadas condições semelhantes às que podem ser utilizadas para a produção de lipases. Os fungos E-3 (*Penicillium*), E-19 (*Trichoderma*) e O-8 (*Aspergillus*) foram selecionados como bons

produtores de lipases através de fermentação submersa, apresentando atividades lipolíticas de 2,81, 2,34 e 2,03 U, respectivamente.

Agradecimentos: ao CNPq pelo apoio financeiro.

4.2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bertolin et al., T.E.; Costa, J.A.V.; Pasquali, G.D.L. Glucoamylase production in batch and fed-batch solid state fermentation: effect of maltose or starch addition. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 13-16, 2001.

Box G.E.P., Hunter W.G., and Hunter J.S. Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. Wiley & Sons, New York, USA, 1978.

Burkert, J.F.M.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 77-84, 2004.

Carvalho, P.O.; Campos, P.R.B.; Noffs, M.D.; Oliveira, J.G.; Shimizu, M.T.; Silva, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

Castro, H.F.; Mendes, A.A.; Santos, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146 – 156, 2004.

Colen, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Tese de doutorado. Faculdade de Farmácia da UFMG. Belo Horizonte, MG, 2006.

Colla, L.M.; Rezzadori, K.; Câmara, S.K.; Debon, J.; Tibolla, M.; Bertolin et al., T.E.; Costa, J.A.V. A solid-state bioprocess for selecting lipase producing filamentous fungi. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 64C, p. 131-137, 2009.

D'Annibale, A.; Sermanni, G.G.; Federici, F.; Petruccioli, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 15, p. 1828-1833, 2005.

Dupuis, C.; Corre, C.; Boyaval, P. Lipase and Esterase Activities of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.12, p. 4004-4009, 1993.

Elibol, M.; Ozer, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rizopus arhizus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 325-329, 2000.

Ertugrul, S.; Dönmez, G.; Takaç, S. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olivemill waste water and improving its enzyme activity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, p. 720–724, 2007.

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.; Saxena, R.K.; Gupta, R. Fermentation and downstream processing of lipase from *Aspergillus terreus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 149-155, 2000.

Haq, I.; Idrees, S.; Rajoka, M. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 637-341, 2002.

Hasan, F.; Shah, A.A.; Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

Joshi, G.K.; Kumar, S.; Tripathi, B.N.; Sharma, V. Production of alkaline lipase by *Corynebacterium paurometabolum* MTCC6841 isolated from lake naukuchiatal, Uttaranchal State, India. **Current Microbiology**, v. 52, p. 354-358, 2006.

Kaushik, R.; Saran, S.; Isar, J.; Saxena, R.K. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p.121-126, 2006.

Kim, H.J.; Youn, S.H.; Shin, C.S. Lipase-catalyzed synthesis of sorbitol–fatty acid esters at extremely high substrate concentrations. **Journal of Biotechnology**, v.123, n. 2, p. 174-184, 2006.

Larios A.; Garcia, HS.; Oliart RM.; Valerio-Alfaro G. Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antártica* lipase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p.373-376, 2004.

Mahadik, N.D.; Puntambekar, U.S.; Bastawde, K.B.; Khire, J.M.; Gokhale, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.

Mahadik, N.D.; Bastawde, K.F.; Puntambekar, U.S.; 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, p. 2031–2034, 2004.

Maia, M.M.D.; Heasley, A.; Camargo de Moraes, M.M.; Melo, E.H.M.; Moraes 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, p. 23-27, 2001.

Makhsumkhanov, A. A.; Yakubov, I. T.; Davranov, K. Conditions for cultivation of the fungus *Penicillium melinii* UZLM-4 and its biosynthesis of lipases. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 40–43, 2003.

Matsumiya, Y.; Wakita, D.; Kimura, A.; Sanpa, S.; Kubo, M. Isolation and characterization of a lipid-degrading bacterium and its application to lipid-containing wastewater treatment. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n.4, p. 325-330, 2007.

Mendes, A.A.; Castro, H.F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296 – 305, 2005.

Miranda, O.A. Salgueiro, A.A.; Pimentel, M.C.B.;Lima Filho, J.L.; Melo, E.H.M. Durfin, N. Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. **Bioresource Technology**, v. 69, p. 145-147, 1999.

Muralidhar, R.V.; Chirumamila, R.R.; Marchant, R.; Nigam, P. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, p. 17-23, 2001.

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

Rao, P.V.; Jayaraman, K.; Laksahmanan, C.M. Production of lipase by *Candida rugosa* in solid state fermentation 1: Determination of significant process variables. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 669-78, 1993.

Roveda, M.; Colla, L.M.; Hemkemeier, M. Produção de lipases por microrganismos isolados de efluentes de laticínios através de fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, aceito para publicação, 2009.

Rosa, D.R.; Cammarota, M.C.; Freire, D.M.G. Production and utilization of a novel solid enzymatic preparation produced by *Penicillium resctrictum* in activated sludge systems treating wastewater with high levels of oil and grease. **Environmental Engineering Science**, v. 23, n. 5, p. 814-823, 2006.

Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, Y. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

Shukla, P.; Gupta, K. Ecological Screening for lipolytic molds and process optimization for lipase production from *Rhizopus oryzae* KG-6. **Journal of Applied Sciences in environmental sanitation**, v. 2, n. 2, p. 35-42, 2007.

Teng, Y.; Xu, Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3900-3907, 2008.

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

4.3. PRODUÇÃO DE LIPASES DE *Aspergillus* spp VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

4.3.1. RESUMO

*A produção de lipases foi realizada a partir de fungos filamentosos em fermentação em estado sólido utilizando planejamentos experimentais. A seleção de variáveis significativas sobre a produção de lipases foi estudada a partir de um Planejamento Fatorial Fracionário (PFF) 2^{7-3}_{IV} . As variáveis estudadas foram o tipo de farelo utilizado como suporte (trigo ou soja), a fonte de nitrogênio (uréia ou nitrato), o indutor (óleo de soja ou azeite de oliva), a concentração da fonte de nitrogênio (1 ou 3%), a concentração de indutor (1 ou 3%), o pH (5 ou 7) e a cepa de *Aspergillus* (O-4 ou E-6). Um Planejamento Fatorial Completo 2^4 foi realizado a fim de estudar as variáveis significativas encontradas no PFF, sendo estudadas as variáveis tipo de farelo, fonte de nitrogênio, indutor e pH. Elevadas atividades lipolíticas (~57 U) foram obtidas utilizando-se o fungo O-4, farelo de soja como principal componente do meio de cultivo, 2% de nitrato de sódio, 2% de azeite de oliva e pH 5.*

Palavras-chave: fermentação em estado sólido, lipases, métodos estatísticos.

4.3.2. ABSTRACT

*Statistical methods were employed to study the production of lipases by filamentous fungi. Firstly, a 2^{7-3} Fractionary Factorial Design was used with the aim of screening significative variables to produce lipases by solid-state bioprocess. The variables studied were the kind of bran used as medium support (wheat or soy), the nitrogen source (urea or nitrate), the additional carbon source (soy or olive oil), the concentration of nitrogen source (1 or 3%), the concentration of inductor (1 or 3%), the pH (5 or 7) and the filamentous fungal strain (O-4 or E-6). A second factorial design was used with the variables bran, nitrogen source, inductor and pH. High lipolytic activities were obtained (57 U) using the isolate *Aspergillus* O, soy bran as the main component of culture medium, 2% of sodium nitrate as nitrogen source, 2% of olive oil as inductor and pH 5.*

Key words: lipase, response surface methodology, solid-state bioprocess.

4.3.3. INTRODUÇÃO

As lipases (triacilglicerol-acilhidrolases) são enzimas que catalisam diversas reações, tais como a reação de hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis, além de reações de esterificação, transesterificação e interesterificação de lipídios. Por este motivo, são aplicáveis em uma diversidade de setores industriais, em especial, na indústria química, na produção de surfactantes (YU et al., 2008, WATANABE et al., 2001), na formulação de detergentes (SAISUBRAMANIAN et al., 2006) na resolução de misturas racêmicas (RAO et al., 1993), no tratamento de resíduos ricos em óleos e gorduras (LEAL et al., 2002) e na área da saúde, compondo medicamentos, em diagnósticos, cosméticos ou antibióticos (HASAN et al., 2006). Na indústria de alimentos apresentam aplicações na síntese emulsificantes (KIM et al., 2006), como os mono e diacilgliceróis (KITTIKUN et al., 2008); na transformação de lipídios, a fim de se produzir lipídios estruturados com elevados teores de ácidos graxos poliinsaturados (RESHMA et al., 2008, WANG et al., 2007); na produção de margarinas; no desenvolvimento de aromas (SALAH et al., 2007); na maturação de queijos (DUPUIS et al., 1993) e embutidos cárneos, entre outros. Recentemente, têm sido utilizadas na indústria da bioenergia, para a produção de biodiesel (PARK et al., 2006).

Apesar das inúmeras aplicações, as enzimas disponíveis comercialmente ainda apresentam custo elevado. Desta forma, a busca por processos de produção de lipases que diminuam os custos finais da enzima é de grande interesse, podendo viabilizar algumas aplicações ainda pouco exploradas, como o tratamento de efluentes ricos em lipídios (ROSA et al., 2005).

A quase totalidade da produção de enzimas microbianas tem sido realizada através de bioprocessos que utilizam o metabolismo de microrganismos crescendo em meios líquidos ou sólidos. Nestes processos, a diminuição dos custos de produção pode ocorrer através da redução do custo dos substratos, a partir da utilização de subprodutos de baixo valor agregado, como os resíduos da agroindústria e efluentes (ERTUGRUL et al., 2007) pela otimização de concentrações de nutrientes e condições de cultivo (TENG e XU, 2008; RODRIGUEZ et al., 2006), levando a maiores produtividades em menores tempos; ou ainda, a partir da manipulação genética dos microrganismos (LIN et al., 2007). Dentre os microrganismos mais utilizados para a produção de lipases estão as bactérias e os fungos (SHARMA et al., 2001), sendo as lipases fúngicas as de maior aplicação industrial, principalmente na indústria de alimentos (MAHADIK et al., 2002). Segundo Shukla e Gupta (2007), as lipases fúngicas são preferidas às bacterianas por atuarem em faixas mais amplas de condições de processo.

A fermentação em estado sólido constitui uma técnica de crescimento de microrganismos na superfície e no interior de partículas porosas úmidas na qual o conteúdo

de líquido contido na matriz sólida deve ser mantido em valores de atividade de água (a_w) que assegurem o conveniente crescimento e metabolismo celular, mas que não excedam a capacidade máxima de retenção de água na matriz (COUTO e SANROMÁN, 2005; PANDEY, 2003). Este método de cultivo apresenta vantagens sobre os processos líquidos, tais como a economia gerada pelos menores espaços necessários para a fermentação, substratos de baixo custo, utilização de equipamentos, maquinário e controles mais simples, maiores rendimentos, menores volumes de água utilizados e menor demanda energética (LONSANE et al., 1985)

A otimização estatística tem sido utilizada em processos biotecnológicos, especialmente na produção de enzimas, por permitirem a seleção de variáveis que influenciam no processo, a avaliação da interação destas variáveis e a redução do número de experimentos, sendo estas as vantagens em comparação com os métodos que otimizam uma variável por vez (KAUSHIK et al., 2006; BOX et al., 1978). O objetivo deste trabalho foi a produção de lipases pelo fungo *Aspergillus* sp. via fermentação em estado sólido e o estudo da influência do meio de cultivo através de técnicas estatísticas de seleção e otimização de variáveis.

4.3.4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.4.1. Microrganismos e preparo do inóculo

Duas cepas de *Aspergillus*, denominadas O-4 e E-6, previamente isoladas de solo contaminado com óleo diesel e efluentes de laticínios, respectivamente, e selecionadas como boas produtoras de lipases através de fermentação em estado sólido (COLLA et al., 2009), foram utilizadas. Os fungos foram mantidos em tubos de ensaio com ABD (agar-dextrose-batata) a 4°C.

O preparo do inóculo foi realizado através da inoculação dos fungos em erlenmeyers de 2 L contendo 300 mL de meio ágar-batata-dextrose solidificado e incubação a 30°C por 5 dias. Após o crescimento, foi preparada uma solução de esporos através da adição de 100 mL de uma solução 0,2% de Tween 80 seguida de raspagem dos esporos com uma alça de Drigalsky e filtração em gaze estéril para retenção das hifas.

4.3.4.2. Meio de cultivo e condições da fermentação

O meio de cultivo foi preparado com 85,7% de farelo de soja ou trigo, utilizado como suporte e fonte de macronutrientes, e 14,3% de casca de arroz, utilizada para aumentar a porosidade do meio e facilitar a transferência de oxigênio. O meio foi adicionado de 71%

(v/p) de solução salina (2 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 1 g L⁻¹ de MgSO₄ e 10 mL L⁻¹ de solução traço, contendo por L: 0,63 mg de FeSO₄.7H₂O, 0,01 mg de MnSO₄, 0,62 mg de ZnSO₄ e água destilada até o volume de 1 L) (BERTOLIN et al., 2001), a fim de fornecer micronutrientes. O meio de cultivo foi autoclavado a 103 kPa por 20 min, sendo posteriormente adicionado de concentrações de 1 ou 3% do indutor (óleo de soja ou azeite de oliva) e 1 ou 3% da fonte de nitrogênio (uréia ou nitrato de sódio), corrigido o pH até o valor indicado no planejamento experimental a partir da adição de uma solução 1,5 M de H₂SO₄ e ajustada a umidade até 60% pela adição de água destilada estéril.

Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 300 mL contendo 50 g de meio e inoculados com 2,5 mL de uma suspensão de esporos de forma que os meios apresentassem concentração inicial de inóculo de 2.10⁶ esporos/g. Os erlenmeyers foram incubados a 30°C por 10 dias, sendo realizadas amostragens a cada 48 h para a determinação da atividade lipolítica. Todos experimentos foram realizados em duplicata.

4.3.4.3. Determinação da atividade lipolítica

As lipases foram extraídas a partir da adição de 10 mL de tampão fosfato (0,1 M; pH 7.0) a 1 g de meio fermentado em erlenmeyers de 250 mL seguido de agitação de 160 min⁻¹ por 30 min a 37°C. Posteriormente, o extrato foi filtrado em algodão para a remoção de sólidos suspensos e o líquido utilizado para a determinação da atividade lipolítica.

A atividade enzimática foi determinada através do método padronizado por Burkert et al. (2004), o qual se baseia na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase presente no extrato enzimático sobre os triacilgliceróis do azeite de oliva emulsionados em goma arábica.

Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ_{mol} de ácido graxo por minuto por grama de farelo fermentado úmido (1U=1 μ_{mol}. min⁻¹ g⁻¹), nas condições do ensaio.

4.3.4.4. Planejamento experimental

A produção de lipases foi realizada utilizando planejamentos experimentais sequenciais. A primeira etapa objetivou a seleção das variáveis significativas na produção de lipases via fermentação em estado sólido, sendo utilizado um Planejamento Fatorial Fracionário (PFF) 2⁷⁻³_{IV} de 16 experimentos (Experimentos 1 a 16). As variáveis estudadas foram o tipo de farelo (trigo ou soja), a fonte de nitrogênio (uréia ou nitrato de sódio), o indutor (óleo de soja ou azeite de oliva), a concentração da fonte de nitrogênio (1 ou 3%), a concentração da fonte de carbono (1 ou 3%), o pH (5 ou 7) e o fungo (O-4 e E-6). As

variáveis farelo, fonte de nitrogênio, indutor e pH, significativas no PFF, foram estudadas através de um Planejamento Fatorial Completo (PFC) 2^4 (Experimentos 17 a 32). Todos os experimentos foram realizados em duplicata. A atividade lipolítica dos farelos fermentados foi utilizada como resposta nas duas etapas experimentais.

4.3.4.5. Tratamento dos dados

Os resultados de atividade lipolítica foram avaliados através de análise de variância (ANOVA), sendo calculados os efeitos estimados e os coeficientes de regressão dos modelos gerados.

4.3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a matriz do PFF 2^{7-3} utilizado para a seleção de variáveis significativas no processo de produção de lipases via fermentação em estado sólido e os resultados de atividade lipolítica obtidos em 6 dias de cultivo, tempo em que foram observadas as maiores atividades lipolíticas na maioria dos experimentos.

Os valores de atividade lipolítica obtidos para os fungos E-6 e O-4 variaram de 16,29 a 49,89 U. As variáveis estudadas influenciaram a produção de lipases por estes fungos, sendo as variáveis estatisticamente significativas ($p < 0,05$) o tipo de farelo, a fonte de nitrogênio, o indutor, o pH e o fungo. Os efeitos estimados das variáveis encontram-se apresentados na Tabela 2, na qual se verifica que as variáveis fungo, fonte de nitrogênio e pH apresentaram efeitos negativos sobre a atividade lipolítica (AL), enquanto que as variáveis indutor e tipo de farelo apresentaram efeitos positivos.

Os maiores resultados de atividade lipolítica foram obtidos utilizando-se o fungo O-4, uréia como fonte de nitrogênio e pH 5. O maior efeito sobre a atividade lipolítica foi ocasionado pelo fungo, sendo que a utilização do fungo O-4 possibilitou a obtenção de atividades lipolíticas em média 15 unidades superiores que o fungo E-6. Desta forma, a seqüência da seleção de variáveis foi realizada utilizando-se o fungo O-4. As variáveis fonte de nitrogênio, fonte de carbono, pH e tipo de farelo foram estudadas na seqüência através de um Planejamento Fatorial Completo 2^4 , cujos resultados de atividade lipolítica em 8 dias de fermentação, tempo em que as maiores atividades foram observadas, estão apresentados na Tabela 3. As variáveis concentração da fonte de nitrogênio e do indutor, não significativas no PFF ($p > 0,05$) foram fixadas em 2%.

Tabela 1 Níveis codificados e reais das variáveis utilizadas no Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} e resultados de atividade lipolítica (U) obtidos em 6 dias de fermentação em estado sólido

| Exp | X ₁ (F) | X ₂ (FN) | X ₃ (CFN) | X ₄ (I) | X ₅ [CI] | X ₆ (pH) | X ₇ (Fungo) | AL* (U) |
|-----|-----------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|---------------------------|--------------|
| 1 | -1 (FT) | -1 (Ur) | -1 (1%) | -1 (OS) | -1 (1%) | -1 (5) | -1 (O-4) | 34,37 ± 0,01 |
| 2 | +1 (FS) | -1 (Ur) | -1 (1%) | -1(OS) | +1 (3%) | -1 (5) | +1 (E-6) | 21,56 ± 0,03 |
| 3 | -1 (FT) | +1 (NS) | -1 (1%) | -1 (OS) | +1 (3%) | +1 (7) | -1 (O-4) | 23,75 ± 1,26 |
| 4 | +1 (FS) | +1 (NS) | -1 (1%) | -1(OS) | -1 (1%) | +1 (7) | +1 (E-6) | 19,83 ± 0,63 |
| 5 | -1 (FT) | -1 (Ur) | +1 (3%) | -1 (OS) | +1 (3%) | +1 (7) | +1 (E-6) | 16,76 ± 0,09 |
| 6 | +1 (FS) | -1 (Ur) | +1 (3%) | -1(OS) | -1 (1%) | +1 (7) | -1 (O-4) | 32,52 ± 0,02 |
| 7 | -1 (FT) | +1 (NS) | +1 (3%) | -1 (OS) | -1 (1%) | -1 (5) | +1 (E-6) | 21,52 ± 0,62 |
| 8 | +1 (FS) | +1 (NS) | +1 (3%) | -1(OS) | +1 (3%) | -1 (5) | -1 (O-4) | 37,39 ± 0,62 |
| 9 | -1 (FT) | -1 (Ur) | -1 (1%) | +1 (AO) | -1 (1%) | +1 (7) | +1 (E-6) | 22,52 ± 0,59 |
| 10 | +1 (FS) | -1 (Ur) | -1 (1%) | +1 (AO) | +1 (3%) | +1 (7) | -1 (O-4) | 45,95 ± 1,16 |
| 11 | -1 (FT) | +1 (NS) | -1 (1%) | +1 (AO) | +1 (3%) | -1 (5) | +1 (E-6) | 16,29 ± 0,56 |
| 12 | +1 (FS) | +1 (NS) | -1 (1%) | +1 (AO) | -1 (1%) | -1 (5) | -1 (O-4) | 40,32 ± 0,61 |
| 13 | -1 (FT) | -1 (Ur) | +1 (3%) | +1 (AO) | +1 (3%) | -1 (5) | -1 (O-4) | 49,89 ± 0,66 |
| 14 | +1 (FS) | -1 (Ur) | +1 (3%) | +1 (AO) | -1 (1%) | -1 (5) | +1 (E-6) | 26,35 ± 0,63 |
| 15 | -1 (FT) | +1 (NS) | +1 (3%) | +1 (AO) | -1 (1%) | +1 (7) | -1 (O-4) | 24,72 ± 0,02 |
| 16 | +1 (FS) | +1 (NS) | +1 (3%) | +1 (AO) | +1 (3%) | -1 (5) | +1 (E-6) | 28,29 ± 0,64 |

F: farelo; FT: farelo de trigo; FS: farelo de soja; FN: fonte de nitrogênio; Ur: uréia; NS: nitrato de sódio; CFN: concentração da fonte de nitrogênio; I: indutor; CI: concentração do indutor; OS: óleo de soja; AO: azeite de oliva. * AL: atividade lipolítica, resultados de média ± desvio-padrão

Os farelos de soja e trigo foram utilizados tanto como suporte para o crescimento quanto como fonte de nutrientes, sendo as maiores atividades lipolíticas encontradas quando o farelo de soja foi utilizado como principal componente do meio de cultivo, o que pode ser observado comparando-se os resultados dos experimentos que utilizaram farelo de soja ao invés de farelo de trigo no PFC (Tabela 3).

O farelo de trigo foi utilizado para a produção de lipases por *Aspergillus niger* por Damaso et al. (2005), apresentando melhores resultados que o sabugo de milho, sendo este fato explicado pelos autores devido a elevada quantidade de carboidratos apresentada pelo farelo de trigo, possivelmente amido. Desta forma, o farelo de trigo, além de atuar como suporte para o crescimento fúngico, constitui-se uma rica fonte de carbono. Em estudo semelhante, Mahadik et al. (2002) observaram que dentre os diferentes resíduos

agroindustriais testados para a produção de lipases pelo *Aspergillus niger* NCIM 1207, o farelo de trigo foi o que apresentou melhores resultados de atividade lipolítica quando comparado com os demais resíduos analisados, porém o farelo de soja não foi utilizado. No presente trabalho, os melhores resultados de atividade lipolítica obtidos com o farelo de soja podem ter sido ocasionados pela composição química deste em comparação com o farelo de trigo, com concentrações de gordura e proteína de 4,02 e 44,86%, respectivamente, em comparação com 2,44% de gordura e 18,85% de proteína no farelo de trigo. TAN et al. (2003) reportaram que o farelo de soja contém ácidos graxos que beneficiam a síntese de lipases.

Tabela 2 Efeitos estimados das variáveis do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3}_{IV} em função da atividade lipolítica obtida em 6 dias de fermentação em estado sólido

| Fonte de variação | Efeito | Erro Padrão | Valor t (56) | p (nível de significância) |
|-------------------|---------|-------------|--------------|----------------------------|
| Média | 28,556 | 0,561 | 50,863 | <0,001 |
| X ₁ | 4,661 | 1,123 | 4,151 | <0,001 |
| X ₂ | -5,365 | 1,123 | -4,777 | <0,001 |
| X ₃ | 0,967 | 1,123 | 0,861 | 0,392 |
| X ₄ | 5,193 | 1,123 | 4,625 | <0,001 |
| X ₅ | 1,578 | 1,123 | 1,405 | 0,165 |
| X ₆ | -5,112 | 1,179 | -4,334 | <0,001 |
| X ₇ | -15,111 | 1,123 | -13,458 | <0,001 |

X₁: farelo; X₂: fonte de nitrogênio; X₃: conc. fonte de nitrogênio; X₄: indutor; X₅: conc. do indutor; X₆: pH; X₇:

Fungo

O azeite de oliva apresentou melhores resultados que o óleo de soja em pH 5. Sharma et al. (2001) citam o azeite de oliva como sendo o melhor indutor para a produção de lipases. O azeite de oliva foi utilizado para a produção de lipases por células livres e imobilizadas de *Aspergillus niger* no estudo realizado por Ellaiah et al. (2004) e as maiores atividades enzimáticas (U/L) foram obtidas na concentração de 1% desta fonte de carbono. D'Annibale et al. (2005) observaram maiores atividades lipolíticas com o uso de azeite de oliva como indutor, na produção de lipases utilizando como substrato os efluentes do processo de extração de azeite de oliva. A adição do azeite de oliva aumentou a atividade enzimática de 1,24 para 9,0 UI mL⁻¹, enquanto a adição dos óleos de milho e soja resultou em atividades de 6,42 e 6,34 UI mL⁻¹, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com os estudos reportados por Yadav et al. (1998) e Freire et al. (1997), que encontraram um aumento na atividade lipolítica quando o óleo de oliva foi incorporado ao meio de cultivo.

Damaso et al. (2005) utilizaram azeite de oliva como indutor da síntese de lipases, sendo obtidas atividades de $10,7 \text{ U mL}^{-1}$ com a adição de 2% de azeite de oliva. Fernandes et al. (2005) estudaram a produção de lipases de *Bacillus megaterium* por fermentação em estado sólido e verificaram que dos indutores citados na literatura, o azeite de oliva é o mais empregado, possivelmente devido a maior porcentagem de trioleína em sua composição e também triacilglicerol, que é substrato para as lipases. Segundo Wang et al. (2008) a diferença de indução da produção de lipases pelos óleos vegetais pode ser explicada pela sua composição em ácidos graxos. O ácido oléico compõe mais que 70% do azeite de oliva, enquanto que os óleos de soja e girassol, por exemplo, apresentam maiores percentuais do ácido linoléico (54 e 68%, respectivamente) e baixos percentuais de ácido oléico.

Tabela 3 Níveis codificados e reais do Planejamento Fatorial Completo 2^4 e resultados de atividade lipolítica (AL) em U, obtidos em 8 dias de fermentação em estado sólido

| Exp. | X ₁ (F) | X ₂ (FN) | X ₃ (I) | X ₄ (pH) | AL (U) |
|------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------|
| 17 | -1 (FT) | -1 (Ur) | -1 (OS) | -1 (5) | 29,97 ± 0,01 |
| 18 | +1 (FS) | -1 (Ur) | -1 (OS) | -1 (5) | 30,93 ± 0,06 |
| 19 | -1 (FT) | +1 (NS) | -1 (OS) | -1 (5) | 31,33 ± 0,48 |
| 20 | +1 (FS) | +1 (NS) | -1 (OS) | -1 (5) | 48,36 ± 0,07 |
| 21 | -1 (FT) | -1 (Ur) | +1 (AO) | -1 (5) | 33,97 ± 0,58 |
| 22 | +1 (FS) | -1 (Ur) | +1 (AO) | -1 (5) | 43,31 ± 0,03 |
| 23 | -1 (FT) | +1 (NS) | +1 (AO) | -1 (5) | 33,43 ± 0,03 |
| 24 | +1 (FS) | +1 (NS) | +1 (AO) | -1 (5) | 57,28 ± 0,14 |
| 25 | -1 (FT) | -1 (Ur) | -1 (OS) | +1 (7) | 39,53 ± 4,98 |
| 26 | +1 (FS) | -1 (Ur) | -1 (OS) | +1 (7) | 28,60 ± 0,59 |
| 27 | -1 (FT) | +1 (NS) | -1 (OS) | +1 (7) | 37,83 ± 0,04 |
| 28 | +1 (FS) | +1 (NS) | -1 (OS) | +1 (7) | 46,40 ± 0,68 |
| 29 | -1 (FT) | -1 (Ur) | +1 (AO) | +1 (7) | 32,74 ± 0,01 |
| 30 | +1 (FS) | -1 (Ur) | +1 (AO) | +1 (7) | 29,57 ± 0,70 |
| 31 | -1 (FT) | +1 (NS) | +1 (AO) | +1 (7) | 36,60 ± 0,82 |
| 32 | +1 (FS) | +1 (NS) | +1 (AO) | +1 (7) | 43,06 ± 0,01 |

F: farelo; FT: farelo de trigo; FS: farelo de soja; FN: fonte de nitrogênio; Ur: uréia; NS: nitrato de sódio; I: indutor; OS: óleo de soja; AO: azeite de oliva. * Resultados de média ± desvio-padrão

A variação do pH de 5 para 7 nos experimentos em que foi utilizado óleo de soja e farelo de trigo (exp. 17 *versus* exp. 25; exp. 19 *versus* exp. 27) ocasionou aumento na atividade lipolítica. O comportamento inverso foi observado quando o óleo de soja e farelo

de soja foram utilizados (exp. 18 *versus* exp. 26; exp. 20 *versus* exp. 28). Nos experimentos que utilizaram azeite de oliva como indutor (mantendo-se constantes a fonte de nitrogênio e o tipo de farelo), com exceção dos experimentos 23 e 31, a variação do pH de 5 para 7 ocasionou uma diminuição da atividade lipolítica. Lin et al. (2006) estudaram a influência do pH na atividade lipolítica, concluindo que os micélios de várias espécies de *Aspergillus* crescem em uma larga escala de valores de pH, sendo este um dos parâmetros ambientais que mais afetam o crescimento micelial.

A análise de variância dos dados do Planejamento Fatorial Completo 2^4 encontra-se apresentada na Tabela 4 e os efeitos estimados das variáveis sobre a atividade lipolítica na Tabela 5.

Tabela 4 Análise de variância dos resultados de atividade lipolítica obtidos nas condições do Planejamento Fatorial Completo 2^4

| | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | F_{calculado} | F_{tabelado} |
|-----------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Regressão | 3873,23 | 10 | 387,32 | 118,61 | 2,02 |
| Resíduo | 173,07 | 53 | 3,26 | | |
| Total | 4046,31 | 63 | | | |

As variáveis tipo de farelo, fonte de nitrogênio, indutor e pH apresentaram efeitos significativos ($p < 0,001$) sobre a atividade lipolítica, sendo que para o tipo de farelo, a fonte de nitrogênio e o indutor os efeitos foram positivos, enquanto que o pH apresentou efeito negativo (Tabela 5). As interações entre as variáveis farelo e fonte de nitrogênio ($X_1.X_2$), farelo e indutor ($X_1.X_3$), farelo e pH ($X_1.X_4$) e indutor e pH ($X_3.X_4$) também apresentaram efeitos significativos ($p < 0,001$). A Figura 1 apresenta as superfícies de resposta das interações de variáveis significativas ($p < 0,05$) sobre a atividade lipolítica.

A Figura 1(a) permite verificar que a maior atividade lipolítica foi encontrada utilizando-se nitrato de sódio como fonte de nitrogênio e farelo de soja. Um resultado semelhante pode ser observado na Figura 1(b), que apresenta a atividade lipolítica em função do farelo e indutor. Independentemente do indutor utilizado (óleo de soja ou azeite de oliva), o uso do farelo de trigo resultou em baixas atividades lipolíticas. As maiores atividades enzimáticas foram observadas na combinação destas variáveis em seus níveis superiores, ou seja, utilizando-se como componentes do meio de cultivo o farelo de soja e o azeite de oliva. As Figuras 1(c) e 1(d) apresentam a influência das variáveis pH versus farelo e indutor, respectivamente, sobre a atividade lipolítica. Verifica-se que, em ambos os casos, o pH 5 resultou em maiores atividades lipolíticas, associado ao farelo de soja (Figura 1c) e ao azeite de oliva (Figura 1d).

Tabela 5 Efeitos estimados das variáveis do Planejamento Fatorial Completo 2⁴ sobre a atividade lipolítica

| Fonte de variação | Efeitos estimados | t(53) | Nível de significância (p) |
|--------------------------------|-------------------|--------|----------------------------|
| Média | 37,68 | 166,82 | < 0,001 |
| X ₁ | 6,51 | 14,42 | < 0,001 |
| X ₂ | 8,21 | 18,17 | < 0,001 |
| X ₃ | 2,12 | 4,70 | < 0,001 |
| X ₄ | -1,78 | -3,95 | < 0,001 |
| X ₁ .X ₂ | 7,46 | 16,52 | < 0,001 |
| X ₁ .X ₃ | 2,60 | 5,77 | < 0,001 |
| X ₁ .X ₄ | -6,28 | -13,90 | < 0,001 |
| X ₂ .X ₃ | -0,52 | -1,14 | 0,257 |
| X ₂ .X ₄ | 0,16 | 0,34 | 0,732 |
| X ₃ .X ₄ | -4,72 | -10,45 | < 0,001 |

X₁: tipo de farelo; X₂: fonte de nitrogênio; X₃: fonte de carbono; X₄: pH

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento do Planejamento Fatorial Fracionário 2⁷⁻³ indicaram a uréia como melhor fonte de nitrogênio para a produção de lipases, o que está de acordo com o encontrado por outros pesquisadores que indicam que fontes orgânicas de nitrogênio (peptona, água de maceração de milho, uréia, extrato de levedura) possibilitam a obtenção de elevadas atividades lipolíticas (SHARMA et al., 2001). Rodriguez et al. (2006) estudaram a substituição de extrato de levedura por peptona, água de maceração de milho, uréia, sulfato de amônio, nitrato de amônio ou nitrato de sódio na produção de lipases usando bagaço de cana como matriz na fermentação em estado sólido. Todas as fontes testadas, com exceção da uréia, diminuíram a produção de lipases em comparação com o extrato de levedura. No presente trabalho, o nitrato de sódio resultou em maiores atividades lipolíticas no Planejamento Fatorial Completo, devendo ser adotado uma vez que este planejamento permite todas as combinações entre as variáveis por estudar um número menor de variáveis com um número maior de experimentos, quando comparado ao Planejamento Fracionário. Os nitratos de sódio e potássio foram as melhores fontes para a produção de lipases através de fermentação submersa por Joshi et al. (2006).

A análise de variância do modelo de regressão gerado demonstrou que o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi muito superior ao valor de F_{tabelado} (Tabela 4). Segundo Muralidhar et al. (2001) o valor de $F_{\text{calculado}}$ deve ser superior ao valor de F_{tabelado} para que a hipótese nula seja rejeitada ao nível de significância estudado, o que implica que a variação causada pelo modelo é significativamente maior que a variação não explicada. Além do valor de F, o coeficiente de

determinação (R^2) também é utilizado para checar a qualidade do modelo (TENG e XU, 2008; KAUSHIK et al., 2006), sendo obtido um valor de R^2 0,957, o que indica que 95,7% da variabilidade da resposta é explicada pelo modelo. O valor de R^2 ajustado corrige o valor de R^2 em relação ao tamanho da amostra e o número de termos do modelo. Neste trabalho, o valor ajustado de R^2 (0,949), foi muito próximo ao valor de R^2 . Esta análise torna possível a geração de um modelo matemático que represente os dados experimentais, o qual é apresentado na Equação 1.

$$AL = 37,68 + 3,26 \cdot X_1 + 4,10 \cdot X_2 + 1,06 \cdot X_3 - 0,89 \cdot X_4 + 3,73 \cdot X_1 \cdot X_2 + 1,30 \cdot X_1 \cdot X_3 - 3,14 \cdot X_1 \cdot X_4 - 2,36 \cdot X_3 \cdot X_4 \quad (1)$$

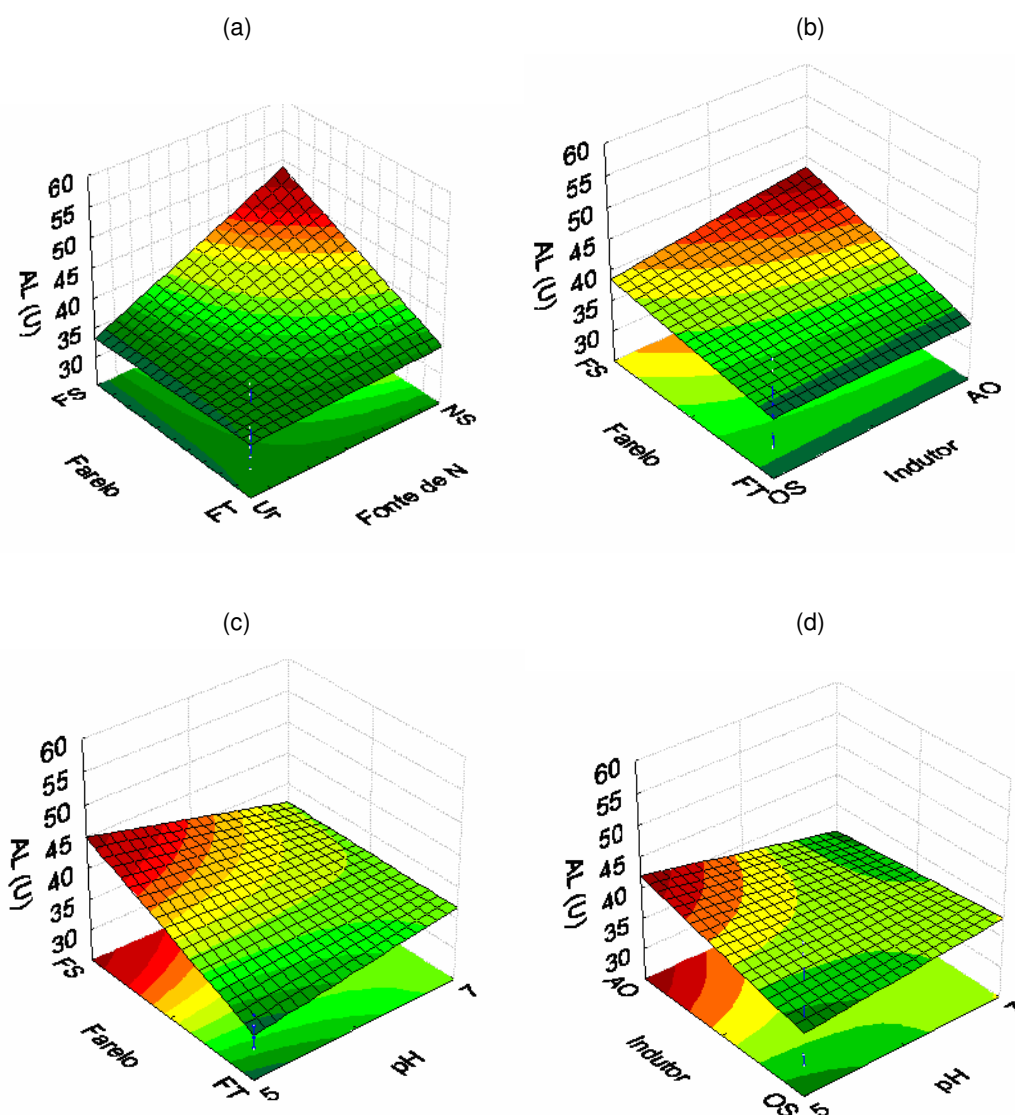


Figura 1 Superfícies de resposta da interação das variáveis F e FN ($X_1 \cdot X_2$), F e I ($X_1 \cdot X_3$), F e pH ($X_1 \cdot X_4$) e I e pH ($X_3 \cdot X_4$) sobre a atividade lipolítica obtida nos experimentos do PCC 2⁴.

FT: farelo de trigo; FS: farelo de soja; Ur: uréia; NS: nitrato de sódio; OS: oleo de soja; AO: azeite de oliva.

Através da análise dos resultados obtidos no Planejamento Fatorial Completo, verificou-se que a maior AL (57,28 U) foi encontrada para o meio de cultivo composto de farelo de soja, 2% de nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, 2% de azeite de oliva como indutor e pH 5, quando utilizado o fungo O-4. O efeito encontrado para o pH foi negativo, significando que maiores atividades lipolíticas poderiam ser obtidas em valores de pH inferiores a 5,0.

A utilização de métodos estatísticos de otimização possibilitou o aumento da produção de lipases via fermentação em estado sólido a partir de *Aspergillus* sp (O-4). As atividades lipolíticas máximas passaram de 49,9 U no planejamento experimental de seleção de variáveis para 57 U no planejamento fatorial completo, sendo estas atividades obtidas utilizando-se farelo de soja como principal componente do meio de cultivo, 2% de nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, 2% de azeite de oliva como indutor em pHs variando de 5 a 7, podendo-se utilizar pH's inferiores a 5, o que está de acordo com os pH's geralmente citados na literatura como sendo ótimos para as fermentações em estado sólido

4.3.6. CONCLUSÃO

As maiores atividades lipolíticas obtidas via fermentação em estado sólido a partir do fungo *Aspergillus* O-4 foram obtidas utilizando-se farelo de soja como principal componente do meio de cultivo, 2% de nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, 2% de azeite de oliva como indutor e pHs inferiores a 5.

Agradecimentos: ao CNPq pelo apoio financeiro.

4.3.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bertolin et al., T.E.; Costa, J.A.V.; Pasquali, G.D.L. Glucoamylase production in batch and fed-batch solid state fermentation: effect of maltose or starch addition. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 13-16, 2001.

Box G.E.P.; Hunter W.G.; Hunter, J.S. Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. Wiley & Sons, New York, USA, 1978

Burkert, J.F.M.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 77-84, 2004.

Colla, L.M.; Rezzadori, K.; Câmara, S.K.; Debon, J.; Tibolla, M.; Bertolin et al., T.E.; Costa, J.A.V. A Solid-State Bioprocess for Selecting Lipase Producing Filamentous Fungi. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 64C, p. 131-137, 2009.

Couto, S.R., Sanromán, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. **Journal of Food Engineering**, v.76, n.3, p. 291-302, 2006.

D'Annibale, A., Sermanni, G.G., Federici, F., Petruccioli, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 15, p. 1828-1833, 2006.

Damaso, M.C.T.; Couri, S.; Passianoto, M.A.; Freitas, S.C. Produção de lipases por fermentação semi-sólida tendo como indutores da síntese, subprodutos do refino do óleo de milho. **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Recife, 2005.

Dupuis, C.; Corre, C.; Boyaval, P. Lipase and esterase activities of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*. **Applied and environmental microbiology**, v.59, n.12, p. 4004-4009, 1993.

Ellaiah, P.; Prabhakar, T.; Ramadrishna, B.; Thaeer Taleb, A.; Adinarayana, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 525-528, 2004.

Ertugrul, S.; Dönmez, G.; Takaç, S. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill waste water and improving its enzyme activity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, p. 720–724, 2007.

Fernandes, M.L.; Meira, J.A.; Mitchell, D.A. Krieger, N. Produção da lipase de *Bacillus megaterium* por PES para aplicação em biocatálise. **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Recife, 2005

Freire, D.M.; Teles, E.M.F.; Bon, E.P.S.; Sant' Anna, G.L. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter: Effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation and aeration. **Appl Biochem Biotechnol**, 63-65: 409-21, 1997.

Hasan, F.; Shah, A.A.; Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

Joshi, G.K.; Kumar, S.; Tripathi, B.N.; Sharma, V. Production of alkaline lipase by *Corynebacterium paurometabolum* MTCC6841 isolated from Lake Naukuchiatal, Uttaranchal State, India. **Current Microbiology**, v. 52, p. 354-358, 2006.

Kaushik, R.; Saran, S.; Isar, J.; Saxena, R.K. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p.121-126, 2006.

Kim, H.J.; Youn, S.H.; Shin, C.S. Lipase-catalyzed synthesis of sorbitol–fatty acid esters at extremely high substrate concentrations. **Journal of Biotechnology**, v.123, n. 2, p. 174-184, 2006.

Kittikun, A.H.; Kaewthong, W.; Cheirsilp, B. Continuous production of monoacylglycerols from palm olein in packed-bed reactor with immobilized lipase PS. **Biochemical Engineering Journal**, v.40, p. 116-120, 2008.

Leal, M.C.M.R.; Cammarota, M.C.C., Freire, D.M.G.; Sant'Anna Jr., G.L. Hidrotytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 175-180, 2002.

Lin, E.S.; Wang, C.C.; Sung, S.C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 98-102, 2006.

Lin, J.; Shi, B.H.; He, Y.X.; Wang, M.Z. Rapid improvement in lipase production of *Penicillium expansum* by Genome shuffling. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 672-676, 2007.

Lonsane, B.K.; Ghildyal, N.P.; Budaitman, S.; Ramakrishna, S.V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 7, p. 258-265, 1985.

Mahadik, N.D.; Puntambekar, U.S.; Bastawde, K.B.; Khire, J.M.; Gokhale, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.

Makhsumkhanov, A. A.; Yakubov, I. T.; Davranov, K. Conditions for cultivation of the fungus *Penicillium melinii* UZLM-4 and its biosynthesis of lipases. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 40–43, 2003.

Muralidhar, R.V.; Chirumamila, R.R.; Marchant, R.; Nigam, P. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, p. 17-23, 2001.

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

Park, E.Y.; Sato, M.; Kojima, S. Fatty acid methyl ester production using lipase-immobilizing silica particles with different particle sizes and different specific surface areas. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 889–896, 2006.

Rao, P.V.; Jayaraman, K.; Laksahmanan, C.M. Production of lipase by *Candida rugosa* in solid state fermentation. 1: Determination of significant process variables. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 669-78, 1993.

Reshma, M.V.; Saritha, S.S.; Balachandran, C.; Arumughan, C. Lipase catalyzed interesterification of palm stearin and rice bran oil blends for preparation of zero trans shortening with bioactive phytochemicals. **Bioresour Technol.**, v. 99, n. 11, p.5011-5019, 2008.

Rodriguez, J.A.; Mateos, J.C.; Nungaray, J.; González, V.; Bhagnagar, T.; Roussos, S.; Cordova, J.; Baratti, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2264-2269, 2006.

Rosa, D.R.; Cammarota, M.C.; Freire, D.M.G. Production and utilization of a novel solid enzymatic preparation produced by *Penicillium resctrictum* in activated sludge systems treating wastewater with high levels of oil and grease. **Environmental Engineering Science**, v. 23, n. 5, p. 814-823, 2006.

Saisubramanian, N.; Edwinoliver, N.G.; Nandakumar, N.; Kamini, N.R.; Puvanakrishnan, R. Efficacy of lipase from *Aspergillus niger* as an additive in detergent formulations: a statistical approach. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 33, p. 669-676, 2006.

Salah, R.B.; Ghamghui, H.; Miled, N.; Mejdoub, H.; Gargouri, Y. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 368–372. 2007

Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, Y. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

Shukla, P.; Gupta, K. Ecological Screening for lipolytic molds and process optimization for lipase production from *Rhizopus oryzae* KG-6. **Journal of Applied Sciences in environmental sanitation**, v. 2, n. 2, p. 35-42, 2007.

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

Teng, Y.; Xu, Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3900-3907, 2008.

Waller, W.; Comeau, L.C. A novel strain of *Candida* species producing an acid-resistant lipase. **Rev Fr Corps Gras**, v. 37, n. 9-10, p. 289-96, 1990

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

Wang, Y.; Li, X.; Liang, Y.; Yang, B.; Zhang, S. Enzymatic fractionation of conjugated linoleic acid isomers by selective esterification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 46, p. 20–25, 2007.

Watanabe, Y.; Miyawaki, Y. Adachi, S.; Nakanishi, K.; Matsuno, R. Continuous production of acyl mannoses by immobilized lipase using a packed-bed reactor and their surfactant properties. **Biochemical Engineering Journal**, v.8, p. 213–216, 2001.

Yadav, R.P.; Saxena, R.K.; Guptha, R.; Davidson, W.S. Lipase production by *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Folia Microbiol**, v. 43,p. 373-8, 1998.

Yu, J.; Zhang, J.; Zhao, A.; Ma, X. Study of glucose ester synthesis by immobilized lipase from *Candida sp.* **Catalysis Communications**, v.9, n. 31, p. 1369-1374, 2008.

4.4. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

4.4.1. RESUMO

A produção de lipases através de fungos filamentos em fermentação submersa pode ser influenciada por vários fatores, tais como a origem do microrganismo, a temperatura da fermentação, o pH, a agitação, a concentração inicial de inóculo, as fontes e concentrações de nutrientes, entre outros. Neste trabalho, um Planejamento do tipo Plackett-Burman de dezesseis experimentos foi realizado com o objetivo de avaliar a influência de nove variáveis sobre a produção de lipases, sendo as variáveis estudadas o tipo de farelo usado como fonte principal de carbono (trigo ou soja), a fonte de nitrogênio (nitrato de sódio e extrato de levedura), a concentração da fonte de nitrogênio (10 ou 30 g L⁻¹), o indutor (óleo de soja ou azeite de oliva), a concentração do indutor (10 ou 30 g L⁻¹), a cepa fúngica (Trichoderma E-19 ou Aspergillus O-8, selecionados como bons produtores de lipases via fermentação submersa), o pH (5 ou 7) e a agitação (120 ou 160 min⁻¹). As variáveis significativas (p<0,05) sobre a produção de lipases foram estudadas através de um Planejamento Fatorial Completo 2³, sendo significativas (p<0,05) a concentração de extrato de levedura e o pH. Estas variáveis foram otimizadas através de um Delineamento Composto Central Rotacional, obtendo-se máximas atividades lipolíticas com a utilização de 45 g L⁻¹ de extrato de levedura e pH 7,15. O modelo estatístico apresentou 94,12% de correlação com os dados experimentais.

Palavras-chave: fermentação submersa, fungos; lipases, planejamento experimental

4.4.2. ABSTRACT

The production of lipases by fungi in submerged bioprocess can be affected by many factors, such as the fungal strain, temperature, pH, agitation, initial inoculum concentration, sources and concentrations of nutrients, among others. In this work, nine variables were screened through a Plackett-Burman Design with sixteen experiments, in order to evaluate its influence on lipase production by fungi, being the variables studied the kind of bran used as main carbon source (wheat or soy-10%), the source or nitrogen (sodium nitrate or yeast extract), the concentration of nitrogen source (10 or 30 g L⁻¹), the source of inductor (olive or soy oil), the concentration of inductor (10 or 30 g L⁻¹), the fungal strain (isolates Trichoderma E-19 or Aspergillus O-8, selected as good producers of lipases), the pH (5 or 7) and the level of agitation (120 or 160 min⁻¹). The significative variables (p<0.05) on lipase production were studied again through a 2³ Factorial Design, being significative (p<0.05) the yeast extract

concentration and the pH. Eventually, these variables were optimized with a Central Composite Design. Maximum lipase activities were obtained with 45 g L⁻¹ of yeast extract and pH 7.15. The statistical model presented 94.12% of correlation with experimental data.

Key words: fungi; lipase; statistical design, submerged bioprocess

4.4.3. INTRODUÇÃO

As enzimas são utilizadas atualmente para uma variedade de aplicações industriais (HAACK et al., 2006). O mercado industrial de enzimas continua crescendo devido à implantação de novas tecnologias de produção, ao uso da engenharia genética na produção e ao surgimento de novos campos de aplicação. O mercado global de enzimas em 2007 foi de 2,3 bilhões de dólares e espera-se que seja de 2,7 bilhões em 2012 (IYER e ANANTHARAYAN, 2008). Dentre estas enzimas, as lipases são muito utilizadas. Suas aplicações decorrem das reações por elas catalisadas, sendo as principais as de hidrólise, inter e transesterificação de lipídios, de onde derivam seus principais usos, nas indústrias de detergentes (SAISUBRAMANIAN et al., 2006), médica (HASAN et al., 2006) e alimentícia (SHARMA et al., 2001). Algumas destas aplicações são a maturação de queijos (DUPUIS et al., 1993), a síntese de aromas (SALAH et al., 2007), a produção de lipídios com elevados teores de ácidos graxos insaturados (RESHMA et al., 2008; WANG et al., 2007), a produção de metil-ésteres de ácidos graxos (biodiesel) (PARK et al., 2006), entre outros.

As enzimas industriais são produzidas principalmente através de fermentação submersa em cultivos em batelada e batelada alimentada (HAACK et al. 2006) usando fungos filamentosos, sendo os gêneros mais citados para a produção de lipases os *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Fusarium* (D'ANIBALLE et al., 2005; HAQ et al., 2002).

Os processos submersos apresentam vantagens sobre os processos em estado sólido, como a maior homogeneidade do meio de cultivo, do que decorre a maior facilidade de realização de controles de parâmetros como a temperatura e o pH (PANDEY et al., 2000). Além disso, Mahadik et al. (2004) colocam como desvantagem dos processos em estado sólido a cor dos meios fermentados, devido à presença dos esporos fúngicos, além de outros componentes remanescentes no extrato após o processo de extração da enzima. No entanto, um dos principais problemas das fermentações submersas é a dificuldade de transferência de oxigênio nos meios líquidos, o que é potencializado no caso do uso de fungos, devido à morfologia filamentosa das hifas em meios líquidos (HAACK et al., 2006).

Outros fatores, como os tipos e concentrações de nutrientes, o pH, a agitação e a presença e concentração de indutores podem afetar a produtividade destes bioprocessos. A

realização de pesquisas que utilizem microrganismos isolados de novos ambientes, bem como a utilização de resíduos agroindustriais na composição dos meios é necessária, a fim de obterem-se elevadas produtividades a custos menores.

A otimização estatística de processos é uma técnica que apresenta vantagens em relação à técnica de otimização de uma variável por vez (KAUSHIK et al., 2006; BOX et al., 1978), tais como o menor número de experimentos e a possibilidade de avaliação dos efeitos de interação entre as variáveis. Inúmeros pesquisadores têm relatado a utilização destas técnicas para a produção de lipases por microrganismos (WANG et al., 2008; TENG e XU, 2008; BURKERT et al., 2004). Dentre os métodos de seleção de variáveis encontram-se os planejamentos Plackett-Burman, os quais permitem uma seleção eficiente de variáveis para a posterior otimização. A seqüência da otimização ocorre pela utilização de planejamentos fatoriais completos e delineamentos compostos centrais rotacionais (RAJENDRAM et al., 2008). Desta forma, objetivou-se selecionar as variáveis significativas sobre a produção de lipases via fermentação submersa e otimizar a produção através do uso de planejamentos experimentais seqüenciais.

4.4.4. MATERIAL E MÉTODOS

4.4.4.1. Microrganismos e preparo do inóculo

Os fungos utilizados neste trabalho, pertencentes aos gêneros *Trichoderma* (E-19) e *Aspergillus* (O-8), foram isolados de efluente de laticínios e solo contaminado com óleo diesel (COLLA et al., 2009) e selecionados previamente como bons produtores de lipases através de fermentação submersa.

Os microrganismos foram mantidos em tubos de ensaio com ABD (ágar- batata-dextrose) a 4°C. O preparo do inóculo foi realizado através da inoculação dos fungos em placas de Petri contendo 30 mL de meio ABD solidificado e incubação a 30°C por 5 dias.

4.4.4.2. Meio de cultivo e aparato experimental

O meio de cultivo foi preparado utilizando-se 10% (m/v) de farelo (trigo ou soja), o qual foi submetido a cozimento a 100°C durante 30 min em 50% do volume total de água destilada. Após, o meio foi filtrado e o extrato solúvel adicionado de 10% (v/v) de solução salina, fonte de nitrogênio e indutor conforme o planejamento experimental. A solução salina continha $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 2 \text{ g L}^{-1}$; $\text{MgSO}_4 - 1 \text{ g L}^{-1}$ e solução traço - 10 mL L^{-1} . A composição da solução traço foi $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,63 \text{ mg}$; $\text{MnSO}_4 - 0,01 \text{ mg}$; $\text{ZnSO}_4 - 0,62 \text{ mg}$ e água destilada até o volume de 1 L (BERTOLIN et al., 2001). O meio líquido foi autoclavado e o

pH do meio ajustado a valores definidos pelo planejamento de experimentos utilizando-se soluções de HCl 1,5 M ou NaOH 1 M.

Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 300 mL com 100 mL de meio inicial. A inoculação foi realizada utilizando-se áreas circulares de 10 e 20 mm de diâmetro do crescimento fúngico realizado em placas de Petri para o preparo do inóculo. Os erlenmeyers contendo o meio de cultivo inoculado foram incubados a 30 °C durante 10 dias em agitador orbital, com nível de agitação previsto pelo planejamento experimental, sendo retiradas alíquotas a cada 24 h para a determinação da atividade lipolítica.

4.4.4.3. Planejamento Experimental

A otimização da produção de lipases através de fermentação submersa foi realizada utilizando-se três planejamentos experimentais sequenciais. A primeira etapa objetivou avaliar a influência de nove variáveis sobre o a produção de lipases utilizando-se um Planejamento Plackett-Burman com 16 experimentos (Experimentos 1 a 16). As variáveis estudadas foram o tipo de farelo utilizado como fonte de carbono (farelo de trigo ou farelo de soja), a fonte de nitrogênio (nitrato de sódio ou extrato de levedura), a concentração da fonte de nitrogênio (10 ou 30 g L⁻¹), o indutor (óleo de soja ou azeite de oliva), a concentração do indutor (10 ou 30 g L⁻¹), o pH do meio de cultivo (5 ou 7), o fungo (E-19 ou O-8), a concentração de inóculo (crescimento fúngico correspondente a 10 ou 20 mm de diâmetro) e a agitação (120 ou 160 min⁻¹). A seguir, um Planejamento Fatorial Completo (PFC) 2³ (Experimentos 17 a 24) foi realizado com o objetivo de estudar a influência da concentração de extrato de levedura (CEL), da concentração de óleo de soja (COS) e do pH, sobre a atividade lipolítica. Posteriormente, as variáveis pH e concentração de extrato de levedura foram otimizadas utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) composto por 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 experimentos (Experimentos 25 a 35). Todos os experimentos foram realizados em duplicata. A atividade lipolítica foi utilizada como resposta nos três planejamentos experimentais. As matrizes de experimentos dos Planejamentos Plackett-Burman, PFC 2³ e DCCR estão apresentadas nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

4.4.4.4. Determinação da atividade lipolítica

As amostras foram filtradas em algodão para a remoção das hifas e os filtrados utilizados para a determinação da atividade lipolítica. A atividade enzimática foi determinada através do método padronizado por Burkert et al. (2004), o qual se baseia na titulação com

NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase presente no extrato enzimático sobre os triacilgliceróis do azeite de oliva emulsionados em goma arábica.

Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto por mL de extrato enzimático ($1\text{U} = 1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$), nas condições do ensaio.

4.4.4.5. Tratamento dos dados

Os resultados de atividade lipolítica ao longo do tempo foram subtraídos dos valores de atividade lipolítica do tempo inicial. As atividades lipolíticas máximas foram analisadas estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) e calculados os efeitos estimados das variáveis e os coeficientes de regressão dos modelos gerados.

4.4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta as atividades lipolíticas máximas obtidas nos experimentos do Planejamento Plackett-Burman, realizado a fim de se determinar, dentre as variáveis estudadas, quais apresentavam influência significativa sobre a produção de lipases via fermentação submersa, sendo estas atividades máximas obtidas entre o terceiro e quarto dias de cultivo. As maiores atividades lipolíticas foram obtidas nos experimentos 3, 8, 11 e 15, todos realizados com extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Quanto ao tipo de farelo utilizado como fonte de carbono, os experimentos 3, 11 e 15 foram realizados com farelo de trigo e o experimento 8 com farelo de soja. Nos experimentos 3 e 11 utilizou-se como indutor o azeite de oliva e nos experimentos 8 e 15 o indutor foi o óleo de soja. O pH 7,0 foi utilizado nos experimentos 3, 8 e 11 e o pH 5,0 no experimento 15. O fungo E-19 (*Trichoderma*) foi utilizado no experimento 3 e nos experimentos 4, 11 e 15 foi utilizado o fungo O-8 (*Aspergillus*). Quanto à agitação, os experimentos 3 e 8 foram realizados com agitação de 120 min^{-1} e os experimentos 11 e 15 com agitação de 160 min^{-1} .

A análise de variância dos resultados do planejamento Plackett Burman indicou que as variáveis tipo de farelo (TF), indutor (I), diâmetro de inóculo (DI) e agitação não apresentaram influência significativa ($p > 0,10$) sobre a produção de lipases através de fermentação submersa nas condições testadas, sendo estas variáveis fixadas nas próximas etapas da otimização.

O farelo de trigo foi utilizado na seqüência da otimização estatística da produção de lipases em fermentação submersa, uma vez que proporcionou condições mais homogêneas do meio de cultivo após a cocção. PINTO et al. (2007), citam que resíduos agroindustriais podem ser valorizados e aproveitados em processos fermentativos. A vantagem de não

haver diferença entre os tipos de farelos a serem usados é a oportunidade de escolher qual usar de acordo com as condições do mercado, como preço, transporte e disponibilidade do produto.

Tabela 1 Níveis codificados e reais das variáveis utilizadas no planejamento Plackett Burman e atividades lipolíticas relativas máximas (U) obtidas nos experimentos realizados em fermentação submersa

| Exp. | X ₁ (F) | X ₂ (FN) | X ₃ (I) | X ₄ (CFN) | X ₅ (CI) | X ₆ (pH) | X ₇ (Fungo) | X ₈ (DI) | X ₉ (A) | AL _{RM} (U) |
|------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 1 | -1 (FT) | -1 (NS) | -1 (AO) | -1 (10) | +1 (30) | +1 (7) | +1 (E-19) | +1 (2) | +1 (160) | 1,74±0,16 |
| 2 | +1 (FS) | -1 (NS) | -1 (AO) | -1 (10) | -1 (10) | -1 (5) | -1 (O-8) | +1 (2) | +1 (160) | 0,31±0,13 |
| 3 | -1 (FT) | +1 (EL) | -1 (AO) | -1 (10) | -1 (10) | +1 (7) | +1 (E-19) | -1 (1) | -1 (120) | 2,03±0,28 |
| 4 | +1 (FS) | +1 (EL) | -1 (AO) | -1 (10) | +1 (30) | -1 (5) | -1 (O-8) | -1 (1) | -1 (120) | 1,50±0,12 |
| 5 | -1 (FT) | -1 (NS) | +1 (OS) | -1 (10) | +1 (30) | -1 (5) | +1 (E-19) | -1 (1) | +1 (160) | 0,19±0,07 |
| 6 | +1 (FS) | -1 (NS) | +1 (OS) | -1 (10) | -1 (10) | +1 (7) | -1 (O-8) | -1 (1) | +1 (160) | 1,21±0,25 |
| 7 | -1 (FT) | +1 (EL) | +1 (OS) | -1 (10) | -1 (10) | -1 (5) | +1 (E-19) | +1 (2) | -1 (120) | 0,84±0,44 |
| 8 | +1 (FS) | +1 (EL) | +1 (OS) | -1 (10) | +1 (30) | +1 (7) | -1 (O-8) | +1 (2) | -1 (120) | 2,93±0,88 |
| 9 | -1 (FT) | -1 (NS) | -1 (AO) | +1 (30) | +1 (30) | +1 (7) | -1 (O-8) | +1 (2) | -1 (120) | 1,62±0,18 |
| 10 | +1 (FS) | -1 (NS) | -1 (AO) | +1 (30) | -1 (10) | -1 (5) | +1 (E-19) | +1 (2) | -1 (120) | 1,36±0,02 |
| 11 | -1 (FT) | +1 (EL) | -1 (AO) | +1 (30) | -1 (10) | +1 (7) | -1 (O-8) | -1 (1) | +1 (160) | 4,08±0,08 |
| 12 | +1 (FS) | +1 (EL) | -1 (AO) | +1 (30) | +1 (30) | -1 (5) | +1 (E-19) | -1 (1) | +1 (160) | 0,86±0,01 |
| 13 | -1 (FT) | -1 (NS) | +1 (OS) | +1 (30) | +1 (30) | -1 (5) | -1 (O-8) | -1 (1) | -1 (120) | 0,37±0,24 |
| 14 | +1 (FS) | -1 (NS) | +1 (OS) | +1 (30) | -1 (10) | +1 (7) | +1 (E-19) | -1 (1) | -1 (120) | 1,39±0,06 |
| 15 | -1 (FT) | +1 (EL) | +1 (OS) | +1 (30) | -1 (10) | -1 (5) | -1 (O-8) | +1 (2) | +1 (160) | 3,51±0,54 |
| 16 | +1 (FS) | +1 (EL) | +1 (OS) | +1 (30) | +1 (30) | +1 (7) | +1 (E-19) | +1 (2) | +1 (160) | 1,68±1,00 |

F: farelo; FT: farelo de trigo; FS: farelo de soja; FN: fonte de nitrogênio; NS: nitrato de sódio; EL: extrato de levedura; CFN: concentração da fonte de nitrogênio (g L⁻¹); I: indutor; CI: concentração do indutor (g L⁻¹); OS: óleo de soja; AO: azeite de oliva; DI: diâmetro de inóculo (cm); A: agitação (min⁻¹); AL_{RM}: atividade lipolítica residual máxima. * Resultados de média ± desvio padrão

O óleo de soja foi escolhido como indutor na seqüência da otimização, uma vez que este apresenta menor custo que o azeite de oliva. Este resultado foi semelhante ao obtido por Burkert et al. (2004), que avaliaram a influência do tipo de óleo (azeite de oliva e o óleo de soja) na produção de lipases por *Geotrichum sp.* e não obtiveram diferença significativa entre os resultados utilizando 1% dos indutores.

Teng e Xu (2008) estudaram a influência de variáveis sobre a produção de lipases. A agitação e a concentração inicial de inóculo foram variáveis significativas, apresentando

influência sobre a morfologia dos micélios. A formação de grupos de hifas enovelados (clumps) foi observada em agitações de 200 min^{-1} , sendo este tipo de morfologia identificado como importante para a síntese de lipases. Em agitações inferiores a 150 min^{-1} , micélios dispersos foram obtidos. As elevadas concentrações iniciais de inóculo levaram a formação de micélios dispersos, o que foi um fator que diminuiu a síntese de lipases por *Candida cylindracea*. Estes resultados foram contraditórios aos obtidos por Haack et al. (2006), que relatam que a presença de hifas dispersas, ao invés de *clumps* ou *pellets*, facilita a síntese de lipases por cepas de fungos filamentosos, uma vez que as outras forma morfológicas ocasionam problemas de difusão do substrato e produto. Por outro lado, a presença de hifas dispersas ocasiona o aumento da viscosidade do meio, diminuindo a transferência de oxigênio. Em nosso trabalho, verificou-se o aumento da viscosidade dos meios durante o processo fermentativo, caracterizando a presença de hifas dispersas, sendo a produção de lipases não afetada pela agitação ou pela concentração inicial de inóculo. Desta forma, nos experimentos posteriores, a inoculação foi realizada utilizando-se 20 mm de diâmetro do crescimento fúngico após o preparo do inóculo e agitação de 120 min^{-1} .

As variáveis fonte de nitrogênio (FN) e fungo foram significativas ($p < 0,001$ e $p = 0,012$), tendo apresentado efeitos de 1,15 e -0,68 U, respectivamente. Desta forma, o extrato de levedura (fonte de nitrogênio utilizada no nível superior) e o fungo O-8 (fungo correspondente ao nível inferior) foram utilizados na continuidade dos experimentos.

As variáveis quantitativas concentração da fonte de nitrogênio (CFN), concentração de óleo de soja (COS) e pH, que apresentaram influência significativa sobre a produção de lipases a um nível de significância de 10%, foram estudadas através de um Planejamento Fatorial Completo 2^3 , cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 2.

A maior atividade lipolítica máxima no PFC 2^3 (2,00 U) foi obtida no experimento 22, realizado com 30 g L^{-1} de extrato de levedura, 10 g L^{-1} de óleo de soja e pH 7. Comparando-se as atividades lipolíticas máximas obtidas nos níveis inferiores e superiores da concentração de extrato de levedura, verifica-se que o aumento da concentração de 10 g L^{-1} para 30 g L^{-1} ocasionou aumento nas atividades lipolíticas. Em relação à concentração de óleo de soja, o aumento da concentração de 10 g L^{-1} para 30 g L^{-1} ocasionou a diminuição da atividade lipolítica na comparação dos experimentos 17 e 19, e 22 e 24; e aumento quando se compara os experimentos 18 e 20, e 21 e 23. Avaliando-se o efeito do pH, os melhores resultados foram obtidos em pH 7,0.

As variáveis concentração de extrato de levedura (CEL) e pH foram significativas sobre a atividade lipolítica segundo a análise de variância dos resultados, com níveis de significância (p) inferiores a 0,001 para ambas variáveis, que apresentaram efeitos positivos de 0,71 e 0,64 U, respectivamente, o que significa que os maiores incrementos nas atividades lipolíticas foram obtidos utilizando-se os níveis superiores destas variáveis, ou

seja, 30 g/L de extrato de levedura e pH 7,0. A concentração de óleo de soja e as interações entre as variáveis não apresentaram efeito significativo sobre a variável resposta ($p < 0,05$).

Tabela 2 Níveis codificados e reais do Planejamento Fatorial Completo 2^3 e resultados de Atividade Lipolítica Máxima (U) obtidos através de fermentação submersa

| Exp. | X_1 (CEL – g L ⁻¹) | X_2 (COS – g L ⁻¹) | X_3 (pH) | * AL _{RM} (U) |
|------|----------------------------------|----------------------------------|------------|------------------------|
| 17 | -1 (10) | -1 (10) | -1 (5,0) | 0,23 ± 0,13 |
| 18 | +1 (30) | -1 (10) | -1 (5,0) | 0,89 ± 0,01 |
| 19 | -1 (10) | +1 (30) | -1 (5,0) | 0,00 ± 0,00 |
| 20 | +1 (30) | +1 (30) | -1 (5,0) | 0,95 ± 0,14 |
| 21 | -1 (10) | -1 (10) | +1 (7,0) | 0,84 ± 0,01 |
| 22 | +1 (30) | -1 (10) | +1 (7,0) | 2,00 ± 0,48 |
| 23 | -1 (10) | +1 (30) | +1 (7,0) | 0,85 ± 0,08 |
| 24 | +1 (30) | +1 (30) | +1 (7,0) | 0,95 ± 0,06 |

CEL: concentração de extrato de levedura (g/L); COS: concentração de óleo de soja (g/L). Variáveis fixas: farelo de trigo, fungo O-8, Diâmetro de inóculo de 2 cm e agitação de 120 min⁻¹. *AL_{RM}: atividade lipolítica residual máxima, resultados de média ± desvio padrão

O modelo matemático da atividade lipolítica máxima apresentou R^2 de 0,714 e $R^2_{ajustado}$ de 0,669, sendo apresentado na Equação 1 (X_1 =Concentração de extrato de levedura; X_3 =pH). O valor F para a regressão foi 16,22 e o $F_{crítico}$ foi 3,80, indicando que a maior parte da variabilidade do modelo foi causada pela regressão, sendo o modelo matemático validado estatisticamente. A Figura 1(a) apresenta a superfície de resposta da atividade lipolítica máxima em função do pH e da concentração de extrato de levedura.

$$AL_{máxima} = 0,839 + 0,357.X_1 + 0,320.X_3 \quad (1)$$

As variáveis pH e concentração de extrato de levedura, significativas no PFC 2^3 foram otimizadas através de um Delineamento Composto Central Rotacional de duas variáveis, sendo a matriz de planejamento e os resultados de atividade lipolítica máxima apresentados na Tabela 3. Como os efeitos destas variáveis foram positivos no PFC 2^3 , os níveis destas variáveis foram aumentados para a realização do DCCR. As maiores atividades lipolíticas nos experimentos do DCCR foram obtidas no tempo de 4 dias de fermentação, sendo estes resultados utilizados para a análise de variância. Os resultados de atividade lipolítica no tempo de 4 dias de fermentação foram diminuídos dos valores de atividade lipolítica do tempo inicial.

Tabela 3 Valores codificados e reais das variáveis pH e concentração de extrato de levedura (CEL), utilizadas no Delineamento Composto Central Rotacional para a otimização da produção de lipases por *Aspergillus* sp (O-8) através de fermentação submersa

| Exp. | X ₁ (pH) | X ₂ (CEL-g L ⁻¹) | AL _{RM} (U)* |
|------|---------------------|---|-----------------------|
| 25 | -1 (6,0) | -1 (20) | 1,87 ± 0,12 |
| 26 | +1 (8,0) | -1 (20) | 2,20 ± 0,10 |
| 27 | -1 (6,0) | +1 (40) | 2,98 ± 0,05 |
| 28 | +1 (8,0) | +1 (40) | 2,92 ± 0,12 |
| 29 | - α (5,5) | 0 (30) | 1,67 ± 0,10 |
| 30 | +α (8,5) | 0 (30) | 2,11 ± 0,07 |
| 31 | 0 (7,0) | - α (15,9) | 1,96 ± 0,02 |
| 32 | 0 (7,0) | +α (44,1) | 2,98 ± 0,05 |
| 33 | 0 (7,0) | 0 (30) | 2,75 ± 0,02 |
| 34 | 0 (7,0) | 0 (30) | 2,93 ± 0,10 |
| 35 | 0 (7,0) | 0 (30) | 3,04 ± 0,02 |

α=1,414; CEL: concentração de extrato de levedura. Variáveis fixas: concentração de óleo de soja:1%; agitação:120 min⁻¹; DI: 2 cm; Fungo: O-8; Farelo: trigo; *AL_{RM}: atividade lipolítica residual máxima, resultados de média ± desvio padrão

A análise de variância dos resultados de atividade lipolítica máxima, apresentada na Tabela 4, demonstrou que o valor F_{calculado} para a regressão foi 33,08 enquanto o valor de F_{crítico} (p:0,05; graus de liberdade da regressão:4; graus de liberdade dos resíduos:17) foi 2,96, validando a superfície de resposta obtida (Figura 1b). O modelo matemático gerado encontra-se apresentado na Equação 2, tendo apresentado coeficiente de determinação (R²) de 0,89 e coeficiente de determinação ajustado de (R²_{ajustado}) 0,86.

As variáveis pH e concentração de extrato de levedura apresentaram efeitos lineares e quadráticos significativos (Tabela 5) Os efeitos lineares de ambas variáveis foram positivos, sendo o maior efeito causado pela concentração de extrato de levedura (0,838 U). Os efeitos quadráticos de ambas variáveis foram negativos, indicando a presença de pontos de máxima atividade para ambas variáveis, conforme a superfície de resposta apresentada na Figura 1(b).

$$AL_{Máxima} = 2,922 + 0,113.pH - 0,433.pH^2 + 0,419.CEL - 0,139.CEL^2 \quad (2)$$

Os níveis ótimos de pH e da concentração de extrato de levedura para obtenção da máxima atividade lipolítica foram obtidos realizado igualando-se a primeira derivada da atividade lipolítica em função do pH e CEL à zero. As máximas atividades lipolíticas foram

obtidas no nível +0,154 para o pH e +1,507 para a CEL, correspondendo ao pH de 7,15 e concentração de extrato de levedura de 45 g L⁻¹.

Tabela 4 Análise de variância dos resultados de atividade lipolítica máxima dos experimentos do DCCR

| | SQ | GL (n-1) | QM | F _{calculado} | F _{crítico} |
|-----------|-------|----------|-------|------------------------|----------------------|
| Regressão | 5,137 | 4 | 1,284 | 33,077 | 2,965 |
| Resíduos | 0,660 | 17 | 0,039 | | |
| SQT | 5,797 | 21 | | | |

SQ: soma dos quadrados, GL: graus de liberdade, QM: quadrado médio, SQT: soma dos quadrados totais. O efeito da interação, não significativo, foi ignorado na realização da análise de variância

Tabela 5 Efeitos estimados das variáveis utilizadas no DCCR e níveis de significância

| | Efeito estimado | t (16) | p |
|--------------------|-----------------|--------|--------|
| Média. | 2,922 | 38,204 | <0,001 |
| X ₁ (L) | 0,225 | 2,404 | 0,035 |
| X ₁ (Q) | -0,867 | -7,775 | <0,001 |
| X ₂ (L) | 0,838 | 8,947 | <0,001 |
| X ₂ (Q) | -0,278 | | 0,029 |

X₁: pH; X₂: concentração de extrato de levedura; L: efeito linear; Q: efeito quadrático; p (nível de significância)

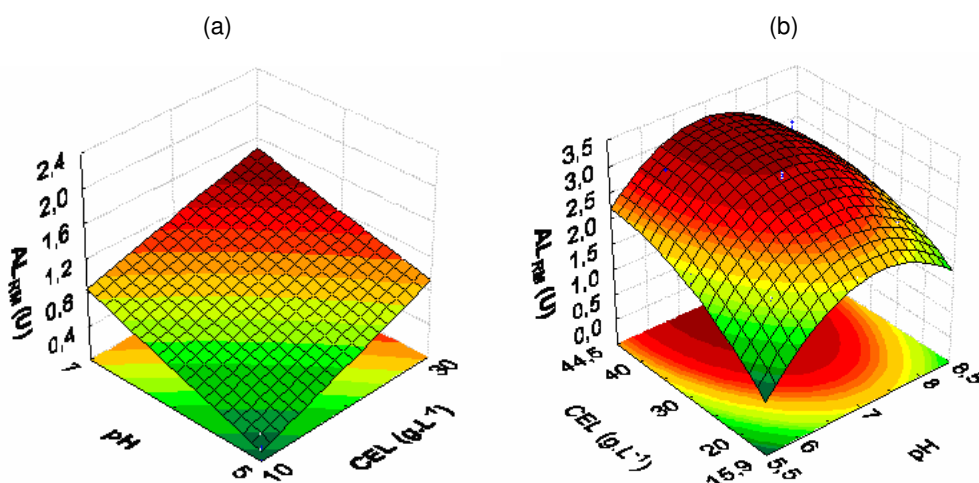


Figura 1 Superfícies de resposta da atividade lipolítica residual máxima (AL_{RM}) em função do pH e da concentração de extrato de levedura (CEL) para a produção de lipases através de fermentação submersa segundo experimentos do PFC 2³ (a) e DCCR (b)

Vários estudos demonstram a importância da fonte de nitrogênio na produção de lipases. Sharma et al. (2001) revisaram as condições de cultivo para a obtenção de máximas atividades lipolíticas por fungos e relatam a utilização de inúmeras fontes de nitrogênio, tais como o extrato de levedura, peptonas, extrato de soja, cloreto de amônio, aminoácidos, entre outras.

As fontes de nitrogênio orgânicas têm sido utilizadas para a produção de lipases por fungos, como relatado por diversos autores. A peptona foi utilizada por Kaushik et al. (2006) para a produção de lipases em fermentação submersa por *Aspergillus carneus*, por Teng e Xu (2008) e Wang et al. (2008), utilizando *Rhizopus chinensis*. O extrato de levedura e a peptona em combinação foram utilizados Mahadik et al. (2004), para a produção de lipases por *A. niger*. Miranda et al. (1999) avaliaram a produção de lipases utilizando resíduos de óleos de refinarias na presença de fontes de nitrogênio como o sulfato de amônio, a uréia e o cloreto de amônio, sendo os melhores resultados obtidos com o cloreto de amônio. Lin et al (2006) utilizaram fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas para a produção de lipases por *Antrodia cinnamomea*, incluindo sais de amônio e nitratos, proteínas, peptídios e aminoácidos, sendo as maiores atividades obtidas com nitratos de sódio e potássio, cloreto de amônio e asparagina. Em nosso trabalho, o extrato de levedura apresentou maiores atividades lipolíticas quando comparado com o nitrato de sódio. O extrato de levedura pode ter apresentado melhores resultados que o nitrato de sódio pelo fato de incluir no meio de cultivo outros componentes, como o esqueleto carbônico e vitaminas, provenientes das células de leveduras.

O pH tem sido considerado uma variável importante na produção de lipases por fermentação submersa por vários autores. Muralidhar et al. (2001) utilizaram pH inicial de 6,5 no cultivo de *Candida cylindracea*. Teng e Xu (2008) estudaram o efeito do pH na produção de lipases por *Rhizopus chinensis*, sendo o pH inicial do meio variado de 5 a 7 e os melhores resultados obtidos em pH 5,5. No presente trabalho, o pH apresentou-se como uma variável importante para a produção de lipases, sendo o valor ótimo em torno de 7,0, o que está de acordo com Gopinath et al. (2003), que estudaram pHs de 4, 7 e 10 na produção de lipases por *Geotrichum candidum*. Dentre os fatores estudados por Wang et al. (2008) para a produção de lipases por *Rhizopus chinensis*, o pH foi o que menos afetou a produção.

Avaliando-se os valores de atividade lipolítica obtidos ao longo dos planejamentos experimentais verifica-se que o fungo O-8 apresentou atividades lipolíticas máximas de 4 U no planejamento Plackett-Burman e de 2 U no Planejamento Fatorial Completo 2³, o que pode ser atribuído a uma perda da capacidade do fungo de produção de lipases, que segundo Makhsumkhanov et al. (2003) pode estar relacionada à depleção dos meios de manutenção durante o armazenamento. Ainda, pode haver o acúmulo de certos metabólitos,

os quais diminuem a produtividade da cultura. A perda de capacidade do fungo durante os períodos de manutenção pode ser resolvida através da utilização de meios de reativação, contendo como única fonte de carbono assimilável os óleos vegetais (MAKHSUMKHANOV et al., 2003). Entretanto, a máxima atividade lipolítica obtida no DCCR foi de 3,04 U, enquanto que o valor predito pelo modelo estatístico para a máxima atividade lipolítica do fungo O-8 é de 3,24 U. Em experimentos realizados previamente para a seleção de fungos produtores de lipases via fermentação submersa, o fungo *Aspergillus* O-8 apresentou atividade lipolítica em torno de 2 U para 4 dias de cultivo, sendo que a atividade lipolítica no tempo inicial correspondia a 1 U, significando que houve a produção de 1 U de enzima durante este tempo. Comparando-se com o valor de atividade lipolítica obtido após a otimização, verifica-se um incremento, o que significa que a otimização das variáveis foi realizada com sucesso.

4.4.6. CONCLUSÃO

A otimização da produção de lipases em fermentação submersa foi possível através de técnicas seqüenciais de planejamento experimental. As condições otimizadas foram obtidas utilizando-se o fungo *Aspergillus* (O-8), 100 g.L⁻¹ de farelo de trigo como principal componente do meio de cultivo, 45 g L⁻¹ de extrato de levedura como fonte de nitrogênio, 20 g L⁻¹ de óleo de soja como indutor e pH 7,15. A otimização das variáveis pH e concentração de extrato de levedura através do delineamento composto central rotacional levou a obtenção de um modelo matemático com coeficiente de correlação de 94,12% com os dados experimentais.

Agradecimentos: ao CNPq pelo apoio financeiro.

4.4.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bertolin et al., T.E.; Costa, J.A.V.; Pasquali, G.D.L. Glucoamylase production in batch and fed-batch solid state fermentation: effect of maltose or starch addition. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 13-16, 2001.

Box G.E.P., Hunter W.G., and Hunter J.S. Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. Wiley & Sons, New York, USA, 1978

Burkert, J.F.M.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 77-84, 2004.

Colla, L.M.; Rezzadori, K.; Câmara, S.K.; Debon, J.; Tibolla, M.; Bertolin et al., T.E.; Costa, J.A.V. A solid-state bioprocess for selecting lipase producing filamentous fungi. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 64C, p. 131-137, 2009.

D'Annibale, A.; Sermanni, G.G.; Federici, F.; Petruccioli, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 15, p. 1828-1833, 2006.

Dupuis, C.; Corre, C.; Boyaval, P. Lipase and esterase activities of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*. **Applied and environmental microbiology**, v.59, n.12, p. 4004-4009, 1993.

Iyer, P.V.; Ananthanarayan, L. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1019–1032, 2008.

Gopinath, S.C.B.; Hilda, A.; Priya, T.L.; Annadurai, G.; Anbu, P. Purification of lipase from *Geotrichum candidum*: conditions optimized for enzyme production using Box-Behnken design. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 681-689, 2003.

Haack, M.B.; Olsson, L.; Hansen, K.; Lantz, A.E. Change in hyphal morphology of *Aspergillus oryzae* during fed batch cultivation. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v. 70, p. 482-487, 2006.

Haq, I.; Idrees, S.; Rajoka, M.I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 637-341, 2002.

Hasan, F.; Shah, A.A.; Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

Kaushik, R.; Saran, S.; Isar, J.; Saxena, R.K. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p.121-126, 2006.

Lin, E.S.; Wang, C.C.; Sung, S.C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 98-102, 2006.

Mahadik, N.D.; Bastawde, K.F.; Puntambekar, U.S.; Khire, J.M.; Gokhale, D.V. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM1207 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2031–2034, 2004.

Makhsumkhanov, A. A.; Yakubov, I. T.; Davranov, K. Conditions for cultivation of the fungus *Penicillium melinii* UZLM-4 and its biosynthesis of lipases. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 40–43, 2003.

Miranda, O.A. Salgueiro, A.A.; Pimentel, M.C.B.; Lima Filho, J.L.; Melo, E.H.M. Durfin, N. Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. **Bioresource Technology**, v. 69, p. 145-147, 1999.

Muralidhar, R.V.; Chirumamila, R.R.; Marchant, R.; Nigam, P. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, p. 17-23, 2001.

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

Park, E.Y.; Sato, M.; Kojima, S. Fatty acid methyl ester production using lipase-immobilizing silica particles with different particle sizes and different specific surface areas. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 889–896, 2006.

Pinto, G. A. S. **Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais.** Disponível em: http://www.cnpq.br/embrapa.br/home/down/index.php?pub/cot_102.pdf. Acesso em: 15/11/2007.

Rajendran, A.; Palanisamy, A.; Thangavelu, V. Evaluation of medium components by Plackett-Burman statistical design for lipase production by *Candida rugosa* and kinetic modeling. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 436-444, 2008.

Reshma, M.V.; Saritha, S.S.; Balachandran, C.; Arumughan, C. Lipase catalyzed interesterification of palm stearin and rice bran oil blends for preparation of zero trans shortening with bioactive phytochemicals. **Bioresource Technol.**, v. 99, n. 11, p.5011-5019, 2008.

Saisubramanian, N.; Edwinoliver, N.G.; Nandakumar, N.; Kamini, N.R.; Puvanakrishnan, R. Efficacy of lipase from *Aspergillus niger* as an additive in detergent formulations: a statistical approach. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 33, p. 669-676, 2006.

Salah, R.B.; Ghamghui, H.; Miled, N.; Mejdoub, H.; Gargouri, Y. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 368–372. 2007

Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, Y. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

Teng, Y.; Xu, Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3900-3907, 2008.

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

4.5. CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LIPASE PRODUZIDA POR *Aspergillus sp* O-4 VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

4.5.1. RESUMO

*As lipases são enzimas capazes de catalisar uma grande gama de reações de interesse para as indústrias alimentícia, farmacêutica, química, entre outras. Esta versatilidade se deve também às diversas possibilidades de especificidade quanto ao substrato que as lipases de diferentes fontes apresentam. As lipases produzidas por microrganismos através de técnicas biotecnológicas apresentam comportamentos específicos os quais dependem do microrganismo produtor, do modo e meios de cultivo utilizados, havendo a necessidade de caracterizar estas enzimas, em especial com relação aos ótimos de atuação e estabilidade à temperatura e pH. Objetivou-se caracterizar as lipases produzidas pelo fungo *Aspergillus sp* (cepa O-4), isolado de solo contaminado com óleo diesel, via fermentação em estado sólido. A lipase foi produzida utilizando-se farelo de soja, pH 4,0, umidade de 60% e adição de 2% das fontes de nitrogênio (nitrato de sódio) e indutor (azeite de oliva). As enzimas foram extraídas e conduzidos os testes para a determinação do pH e temperatura ótimos para a obtenção da maior atividade enzimática, utilizando-se um Planejamento Fatorial Completo 3², sendo testadas combinações dos pHs e temperaturas de 5 a 7 e 30 a 40°C, respectivamente. A estabilidade térmica e ao pH foi determinada. O pH e temperaturas ótimos da enzima foram pH 6,0 e temperatura de 35 °C. A enzima apresentou estabilidade moderada a temperatura, mantendo 63,6 e 26,8% de atividade residual após 1 h de exposição a 50 e 60°C, respectivamente). A energia de desativação das lipases foi de 60,33 KJ mol⁻¹.*

Palavras-chave: Aspergillus, fermentação em estado sólido, estabilidade, lipases, pH e temperatura.

4.5.2. ABSTRACT

*Lipases are enzymes which catalyse a great variety of reactions of interest to many sectors, as food, pharmaceutical and chemical industries, among others. Microbial lipases produced by biotechnological techniques can present differences that could depend of microorganism strain, medium and cultivativon process. Because of that, it is necessary to characterize these enzymes, especially in relation to the optimal pH and temperature activities and stability. The aim of this work was to do the partial characterization of the lipases produced by a strain of *Aspergillus sp* (denominated O-4) in solid-state fermentation, which was*

isolated from a soil contaminated with diesel oil. Lipases were produced in erlenmeyer flasks using soy bran, pH 4.0, humidity of 60%, 30°C, 2% of sodium nitrate and olive oil as sources of nitrogen and inductor, respectively. The enzymes were extracted and the optimal pH and temperature to the maximal activity determined using a 3² Factorial Design, being tested pH's and temperatures from 5 to 7 and 30 from 40°C, respectively. The thermal and pH stability was also accomplished. The optimal activities of lipases produced were obtained with pH 6.0 and temperature of 35 °C. Lipases presented moderated stability to the temperature, mantaining 63.6 and 26.8% of activity after one hour of exposition to 50 and 60°C, respectively, being the desactivation energy of 60.33 KJ mol⁻¹. The pH stability was higher in alkaline pH's, with residual activities higher than 60%.

Key words: Aspergillus, FES, lipase, optimal pH and temperature, stability

4.5.3. INTRODUÇÃO

As lipases (triacilglicerol-acil-hidrolases E.C.3.1.1.3.) são enzimas capazes de hidrolizar ligações éster de substratos insolúveis em água na interface entre o substrato e a água, que catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG) fornecendo diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres (SHARMA et al., 2001). As principais aplicações das lipases encontram-se nas indústrias de detergentes (SAISUBRAMANIAN et al., 2006), médica (HASAN et al., 2006) e alimentícia (SHARMA et al., 2001), como por exemplo na maturação de queijos (DUPUIS et al., 1993), na síntese de aromas (SALAH et al., 2007), na produção de lipídios com elevados teores de ácidos graxos insaturados (RESHMA et al., 2008, WANG et al., 2007) e na produção de metil-ésteres de ácidos graxos (biodiesel) (PARK et al., 2006).

As lipases obtidas de diferentes microrganismos podem apresentar diferentes propriedades (MALDONADO, 2006). A fim de definir suas aplicações industriais, torna-se necessário a sua caracterização, em especial com relação a sua estabilidade à temperatura e pH (IYER e ANANTHANARAYAN, 2008).

A atividade ótima da enzima depende da integridade de sua estrutura primária, assim, condições que afetem a conformação, como o pH, a temperatura, agentes químicos, autólise (proteases) e força iônica afetam a máxima atividade da enzima (IYER e ANANTHANARAYAN, 2008). Dada a importância da caracterização de novas enzimas a fim de definir a sua utilização, objetivou-se caracterizar as lipases obtidas por uma cepa de *Aspergillus* sp. (O-4), isolada de solo contaminado com óleo diesel quanto aos ótimos de temperatura e pH e determinar a estabilidade da enzima a estes fatores.

4.5.4. MATERIAL E MÉTODOS

4.5.4.1. Produção da enzima

O fungo filamentoso *Aspergillus sp.* (cepa O-4), foi isolado de solo contaminado por óleo diesel e selecionado como bom produtor de lipase via fermentação em estado sólido (COLLA et al., 2009). Após isolamento, o microrganismo foi mantido em tubos com ágar-batata-dextrose (ABD) inclinado sob refrigeração a 4°C, sendo realizadas repicagens periódicas a cada 3 meses. O preparo do inóculo foi realizado através da inoculação dos fungos em erlenmeyers de 1 L contendo 30 mL de meio ABD solidificado e incubação a 30°C por 5 dias. Uma suspensão de esporos foi obtida adicionando-se 20 mL de uma solução de Tween 0,1% ao inóculo após a incubação, realizando-se a raspagem dos esporos com auxílio de uma alça de Drigalsky. Os meios foram inoculados com 2.10^6 esporos g^{-1} .

O meio de cultivo para a fermentação em estado sólido foi preparado segundo condições otimizadas previamente, nas quais se utilizou 85,7% de farelo de soja ou trigo, e 14,3% de casca de arroz. O meio foi adicionado de 71% (v/p) de solução salina (2 g L^{-1} de KH_2PO_4 , 1 g L^{-1} de $MgSO_4$ e 10 mL L^{-1} de solução traço, contendo ($mg.L^{-1}$): $FeSO_4.7H_2O$ (0,63), $MnSO_4$ (0,01), $ZnSO_4$ (0,62) (BERTOLIN et al., 2001) e 2% de nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. O meio de cultivo foi autoclavado a 103 kPa por 20 min, sendo posteriormente adicionado de 2% de azeite de oliva como indutor da produção de lipases. O pH do meio foi corrigido a 4,5 a partir da adição de uma solução 1,5 M de H_2SO_4 e a umidade foi ajustada até 60% pela adição de água destilada estéril.

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 300 mL contendo 50 g de meio, os quais, após inoculação, foram incubados a 30°C por 96 h. Os farelos fermentados foram mantidos a -20°C até a utilização.

4.5.4.2. Extração da lipase

A extração da lipase do meio sólido fermentado foi realizada adicionando-se 10 mL de solução tampão com pH estabelecido pelo delineamento experimental a 1 g de meio fermentado, seguido de agitação de 160 min^{-1} por 30 min a 37°C. O extrato obtido foi filtrado em algodão e utilizado como extrato enzimático nas reações posteriores.

4.5.4.3. Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática

O pH e temperatura ótimos das lipases foram determinados utilizando-se um Planejamento Fatorial Completo 3^2 (Tabela 1). Os níveis das variáveis foram 5 a 7 para o pH e 30 a 40°C para a temperatura. Todos os experimentos foram realizados em tréplicas. Os ensaios em pH 5 foram realizados utilizando-se tampão acetato (0,2 M). Os ensaios em pHs 6 e 7 foram realizados utilizando-se o tampão fosfato (0,2 M).

A atividade enzimática foi determinada através do método padronizado por Burkert et al. (2004). O método baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase presente no extrato enzimático sobre os triacilgliceróis do azeite de oliva emulsionados em goma arábica. Em frascos de 250 mL adicionou-se 2 mL de tampão fosfato 0,2 M com pH pré-estabelecido no planejamento experimental, 5 mL de emulsão preparada com 75 mL de goma arábica a 7% e 25 mL de azeite de oliva. A este sistema adicionou-se 1 mL de extrato enzimático e incubou-se nas temperaturas previstas pelo planejamento experimental durante 30 min. Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de 15 mL de solução acetona:etanol:água (1:1:1) e titulou-se os ácido graxos liberados com uma solução de NaOH 0,01 M utilizando fenolftaleína como indicador.

Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera $1 \mu_{\text{mol}}$ de ácido graxo por minuto por grama de meio fermentado ($1U = 1 \mu_{\text{mol}} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$), nas condições do ensaio.

4.5.4.4. Estabilidade térmica da lipase

A estabilidade à temperatura foi determinada através da incubação de enzima em temperaturas de 35 a 90°C. A extração das enzimas foi realizada utilizando-se tampão fosfato pH 6,0 (0,2 M). Alíquotas dos extratos enzimáticos foram removidas durante o tempo de incubação para a determinação da atividade lipolítica residual, que foi determinada a 35°C. Os experimentos foram realizados em réplica.

Os dados de atividade enzimática em cada temperatura testada (35 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C e 90 °C) foram utilizados para o cálculo da atividade lipolítica residual (AR) ao longo do tempo. A constante de desativação térmica (k_d) em cada temperatura foi calculada através da regressão linear dos dados de Ln (AR) versus tempo, segundo o modelo cinético de Arrhenius, considerando-se que a inativação da enzima segue uma cinética de primeira ordem, conforme as Equações 1 a 4.

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_d \cdot t \quad (1)$$

Após integração:

$$\ln \frac{[E]_2}{[E]_1} = -k_d \cdot \Delta t \quad (2)$$

Considerando que a concentração da enzima ([E]) seja diretamente proporcional à velocidade da reação enzimática, tem-se que:

$$\frac{[E]_2}{[E]_1} = AR \quad (3)$$

Obtém-se:

$$\ln(AR) = -k_d \cdot \Delta t \quad (4)$$

A partir das constantes de desativação térmica em cada temperatura, foram obtidos os tempos de meia vida ($t_{1/2}$) (Equação 5) que corresponde ao tempo necessário, na temperatura testada, para que seja inativada 50% da concentração enzimática inicial.

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_d} \quad (5)$$

A energia de ativação (E_a) para a destruição térmica da enzima foi calculada a partir da Equação 6, sendo o valor de E_a obtido a partir da inclinação da reta da regressão de $\ln K$ versus $1/T$.

$$\ln K = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (6)$$

Onde:

[E] = concentração da enzima;

AR = atividade residual da enzima;

t = tempo (min);

k_d = constante de desativação térmica;

A = fator de Arrhenius (depende, dentre outros, da área de contato);

E_a = Energia de ativação;

R = constante dos gases ideais ($8,314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$);

T = temperatura absoluta (K).

4.5.4.5. Estabilidade ao pH

A fim de avaliar a estabilidade das enzimas ao pH, as lipases foram extraídas do meio fermentado utilizando soluções tampões: citrato 0,1 M (pH 3,5), acetato 0,2 M (pHs 4,0; 4,5; 5,0 e 5,5), fosfato 0,2 M (pHs 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0) e glicina 0,2 M (pHs 9 e 10). Os extratos foram mantidos a 25°C durante 24 h e a atividade lipolítica residual determinada a 35°C e pH 6,0 (tampão fosfato 0,2 M).

4.5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.5.1. Determinação do pH e temperatura ótimos da lipase

A Tabela 1 apresenta os resultados de atividade lipolítica nas diferentes condições de pH e temperatura do Planejamento Fatorial Completo 3². As maiores atividades enzimáticas foram obtidas em pH 6,0 e 35°C. Os pHs 5 e 7 apresentaram influência negativa sobre as atividades enzimáticas para qualquer temperatura testada (30, 35 e 40°C). O mesmo foi observado para 30 e 40°C, mantendo-se constantes os pHs. A Tabela 2 apresenta a análise de variância dos dados de atividade lipolítica dos experimentos do Planejamento Fatorial Completo 3². O valor de $F_{\text{calculado}}$, 11,44 vezes superior ao F_{tabelado} , bem como os valores de R^2 (0,884) e R^2 ajustado (0,857), validam o modelo matemático obtido (TENG e XU, 2008; KAUSHIK et al., 2006), o qual é apresentado na Equação 7.

Tabela 1 Variáveis reais e codificadas da Matriz do Planejamento Fatorial Completo 3² utilizado para a verificação da influência do pH e temperatura sobre a atividade lipolítica das lipases produzidas via fermentação em estado sólido através do *Aspergillus* sp O-4 e resultados de atividade lipolítica

| Experimento | pH (X ₁) | Temperatura (°C) (X ₂) | Atividade Lipolítica (U)* |
|-------------|----------------------|------------------------------------|---------------------------|
| 1 | 5 (-1) | 30 (-1) | 12,20 ± 0,96 |
| 2 | 6 (0) | 30 (-1) | 40,62 ± 1,90 |
| 3 | 7 (+1) | 30 (-1) | 15,49 ± 1,92 |
| 4 | 5 (-1) | 35 (0) | 34,14 ± 2,52 |
| 5 | 6 (0) | 35 (0) | 42,82 ± 1,65 |
| 6 | 7 (+1) | 35 (0) | 35,41 ± 1,92 |
| 7 | 5 (-1) | 40 (+1) | 10,53 ± 0,96 |
| 8 | 6 (0) | 40 (+1) | 34,58 ± 1,65 |
| 9 | 7 (+1) | 40 (+1) | 22,13 ± 0,96 |

* Resultados de média ± desvio-padrão

$$AL = 49,2 + 2,7.X_1 - 17,7.X_1^2 - 14,9.X_2^2 \quad (7)$$

Os efeitos linear e quadrático da variável pH foram significativos ($p=0,02$ e $p<0,01$, respectivamente) e positivos sobre a atividade lipolítica, de 5,4 e -35,4 U, respectivamente. Por outro lado, somente o efeito quadrático da temperatura (-29,7 U) apresentou influência

significativa ($<0,01$) sobre a atividade lipolítica. O cálculo do pH e temperatura ótimos para obtenção da máxima atividade lipolítica foi realizado igualando-se a primeira derivada da atividade lipolítica em função do pH e temperatura à zero. As máximas atividades lipolíticas foram obtidas no nível +0,076 para o pH e zero (0) para a temperatura, correspondendo ao pH de 6,0 e 35°C, o que também pode ser visualizado através da superfície de resposta apresentada na Figura 1.

Tabela 2 Análise de variância dos dados de atividade lipolítica em função do pH e temperatura, obtidos no Planejamento Fatorial Completo 3^2

| Fonte de variação | Soma dos Quadrados | Gráus de liberdade | Quadrado Médio | $F_{\text{calculado}}$ | F_{tabelado} |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|------------------------|-----------------------|
| Regressão | 3386,2 | 5 | 677,2 | 32,2 | 2,8 |
| Resíduos | 441,0 | 21 | 21,0 | | |
| Total | 3827,2 | 26 | | | |

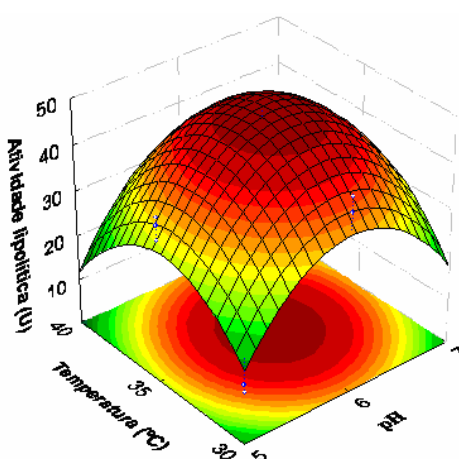


Figura 1 Superfície de resposta da influência da temperatura e pH sobre a atividade lipolítica

Os valores de pH e temperatura ótimos encontrados neste trabalho para a atividade das lipases fúngicas são semelhantes a resultados relatados na literatura, que citam que as atividades máximas de lipases foram obtidas em torno de 35 e 40°C e pHs de 6,0 a 8,0. Maldonado (2006) obtiveram máximas atividades lipolíticas em pH 7,0 e temperatura de 37°C para a lipase bruta e purificada de *Geotrichum candidum*. Baron et al. (2005) verificaram a existência de uma faixa de pH (6,0 e 8,0) onde a atividade enzimática é máxima, e ainda que a atividade depende não somente do valor do pH do meio mas também do tipo de tampão utilizado. Freire et al. (1997) relataram que o pH e temperatura ótimos para as lipases produzidas por *Penicillium sp* foram de 7,0 e 37°C. Benjamin e

Pandey (2000) relataram que as lipases produzidas por *Candida rugosa* apresentaram atividade ótima em pH 7,0 e temperatura de 40°C. Pastore et al. (2003) caracterizaram as lipases produzidas por *Rhizopus sp.* e encontraram máximas atividades em pH 6,0 e 6,5 e 40°C. Já Diaz et al (2006) caracterizaram as lipases do fungo *Rhizopus homothallicus* produzidas em bioprocessos em estado sólido e submerso, obtendo atividade máxima para as enzimas produzidas em bioprocessos em estado sólido e submerso em pH 7,5 e 30 a 40°C, respectivamente. Pokorny et al (1997) obtiveram máximas atividades das lipases de *Aspergillus niger* em pH 7,0 e 40°C.

Santos et al. (2005) e Lotrakul e Dharmstithi (1997) caracterizaram lipases que obtiveram máximas atividades em temperaturas superiores às obtidas neste trabalho, de 45 a 50°C para a lipase produzida por *Trichosporon spp.* em fermentação em estado sólido e 45°C para a lipase de *Aeromonas sóbria* isolada do leite cru, respectivamente.

4.5.5.2. Estabilidade Térmica

A Figura 2 apresenta a cinética de destruição térmica da enzima entre 35 a 90°C, verificando-se que a enzima segue o padrão de destruição térmica predito pelo modelo de Arrhenius, de primeira ordem.

A Tabela 3 apresenta as constantes de desativação térmica entre 35 a 90°C, obtidas a partir dos coeficientes angulares das retas mostradas na Figura 2, bem como os coeficientes de determinação das regressões e o tempo de meia vida para as enzimas em cada temperatura. A enzima apresentou maior estabilidade térmica em 35 e 40°C, o que pode ser observado pelos tempos de meia vida ($t_{1/2}$) elevados, em torno de 6 e 4,3 h, respectivamente. Acima de 50°C os tempos de meia vida diminuíram consideravelmente, sendo de 29 min entre 60 e 70°C.

Razak et al. (1997) relatam que lipases fúngicas de um modo geral são pouco estáveis acima de 40°C, apresentando estabilidade moderada, ao contrário do que é observado por lipases obtidas por bactérias como *Bacillus* (GHANEM et al., 2000; NAAWANI et al, 1998) e *Pseudomonas* (KULKARNI e GADRE, 2000), que apresentaram termoestabilidade acima de 60°C. Entretanto, as lipases produzidas por *Rhizopus sp* mantiveram 50% ou mais de sua atividade quando aquecida por 60 min entre 40 e 55 °C (PASTORE et al., 2003) e as lipases produzidas por *Geotrichum-like* R59 apresentaram termoestabilidade, com atividade residual máxima após incubação a 60°C por 1 h (GINALSKA et al., 2004). Segundo Diaz et al (2006) mesmo para lipases idênticas produzidas por modos de cultivo diferentes (submerso e em estado sólido), pode haver diferença na termoestabilidade, ocasionada pela ligação de compostos não protéicos

oriundos do meio de cultivo através de ligações não covalentes às lipases, alterando suas propriedades físico-químicas.

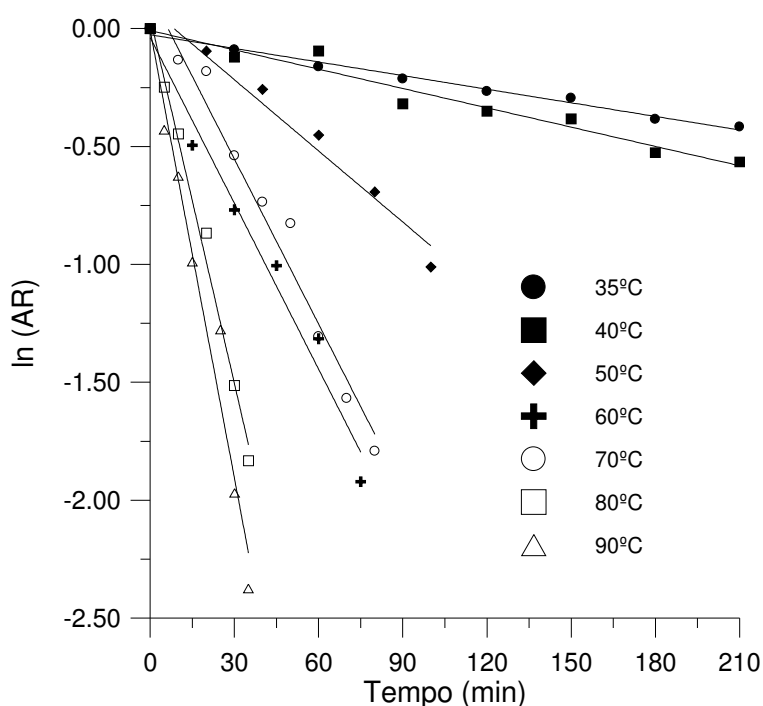


Figura 2 Cinética de destruição térmica da enzima em temperaturas de 35 a 90°C

AR: atividade enzimática residual

Tabela 3 Constante de desativação térmica (k_d), coeficientes de correlação das regressões de $\ln(k)$ versus tempo e tempos de meia vida ($t_{1/2}$) das enzimas em temperaturas de 35 a 90°C

| Temperatura (°C) | k_d (min^{-1}) | R^2 | $t_{1/2}$ (min) |
|------------------|-----------------------------|-------|-----------------|
| 35 | 0,0019 | 0,985 | 364,74 |
| 40 | 0,0027 | 0,954 | 256,67 |
| 50 | 0,0100 | 0,966 | 69,30 |
| 60 | 0,0234 | 0,976 | 29,62 |
| 70 | 0,0233 | 0,971 | 29,74 |
| 80 | 0,0516 | 0,991 | 13,43 |
| 90 | 0,0630 | 0,968 | 11,00 |

A Figura 3 apresenta o gráfico de $\ln(k_d)$ em função da temperatura absoluta (K), utilizada para o cálculo da energia de desativação térmica, que foi de 60,33 kJ mol^{-1} para a enzima estudada. A lipase obtida no presente trabalho apresentou energia de desativação superior às obtidas por Diaz et al (2006) e Lima et al (2005), de 30 e 34,2 kJ mol^{-1} , para as

lipases produzidas por *Rhizopus homothallicus* e *Bacillus megaterium*, respectivamente. Entretanto, apresentou energia de desativação inferior as obtidas por Maldonado (2006), de 330, 140 e 182 kJ mol⁻¹ para as lipases produzidas por *Geotrichum candidum* em meios contendo peptona, hidrolisado de levedura e água de maceração de milho clarificada, respectivamente. A energia de ativação reflete a dependência da constante de desativação térmica com relação à temperatura (ATKINS e JONES, 2001; FENNEMA, 2000), assim, quanto maior a constante, maior é a variação da constante de desativação térmica com a variação da temperatura.

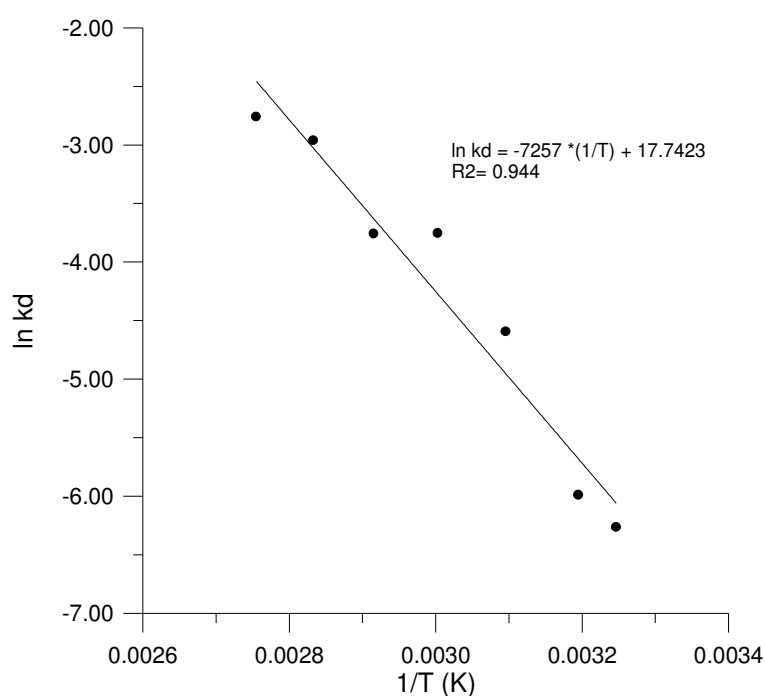


Figura 3 Regressão linear das constantes de desativação térmica obtidas nas temperaturas de 35 a 90°C (ln dos dados) em função do inverso da temperatura absoluta para o cálculo da energia de desativação térmica da enzima

4.5.5.3. Estabilidade ao pH

As lipases produzidas via fermentação em estado sólido pelo fungo *Aspergillus* O-4 apresentaram maior estabilidade em pHs superiores a 7,0, como é mostrado na Figura 4, com atividades residuais superiores a 60%. Em pH's ácidos (4 a 6) a estabilidade da enzima após 24 h foi de em torno de 50%. Verificou-se que a enzima apresentou ótimo de atividade em pH ácido (6,0), enquanto que a maior estabilidade foi observada em pH's alcalinos. Este comportamento é similar ao observado por Mhetras et al. (2009), que relataram que as lipases produzidas por *Aspergillus niger* NCIM 1207 apresentaram estabilidade em pH alcalino (pH's 8 a 11) embora tenham apresentado atividades ótimas em pH's ácidos.

Sharma et al. (2002) relataram que as lipases produzidas por *Bacillus sp.* RSJ-1 apresentaram 84 e 82% de atividade residual, respectivamente, após 2 h em pH's 8 e 9. As lipases produzidas por *Candida sp* 99-125 apresentaram-se estáveis em pH's de 7,5 a 8,5 durante 15 min (FU et al., 2009).

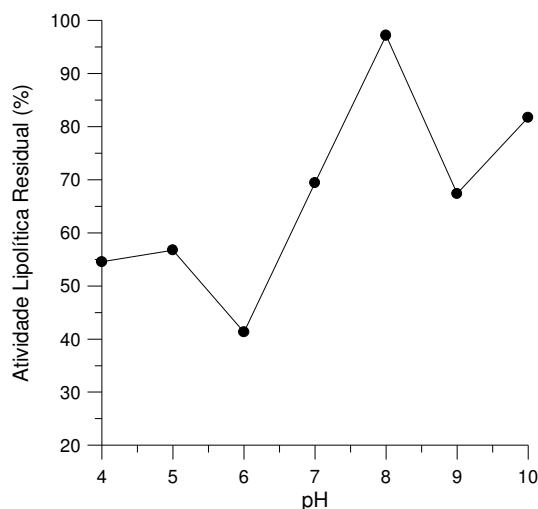


Figura 4 Estabilidade ao pH das lipases produzidas pelo fungo *Aspergillus sp* (cepa O-4) via fermentação em estado sólido

4.5.6. CONCLUSÃO

As lipases caracterizadas neste trabalho, produzidas a partir do fungo *Aspergillus sp.* (O-4) através de fermentação em estado sólido, apresentaram temperatura e pH ótimos em torno de 35°C e pH 6,0 e estabilidade à temperatura (63,6 e 26,8% de atividade residual após 1 h de exposição a 50 ° e 60°C, respectivamente). A estabilidade ao pH foi superior em pH's alcalinos, com atividades residuais superiores a 60%, após 24 h de exposição.

Agradecimentos: ao CNPq pelo apoio financeiro.

4.5.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Atkins, P.; Jones, L. **Princípios de Química: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente**. Editora Porto Alegre: Bookman, 2001. ISBN: 85-7307-739-5.

Baron, A.M.; Turra, V.M.Z.; Mitchell, D.A.; Krieger, N. Produção e caracterização de lipases *Penicillium corylophilum* IOC 4211. In: XV **Simpósio Nacional de Fermentações**, Anais, Recife, p. 30-35, 2005.

Benjamin, S.; Pandey, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.44, n.2, p. 213-221, 2000.

Bertolin et al., T.E.; Costa, J.A.V.; Pasquali, G.D.L. Glucoamylase production in batch and fed-batch solid state fermentation: effect of maltose or starch addition. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 13-16, 2001.

Burkert, J.F.M.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 77-84, 2004.

Colla, L.M.; Rezzadori, K.; Câmara, S.K.; Debon, J.; Tibolla, M.; Bertolin et al., T.E.; Costa, J.A.V. A solid-state bioprocess for selecting lipase producing filamentous fungi. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 64C, p. 131-137, 2009.

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, n. 5, p. 1042-1050, 2006.

Dupuis, C.; Corre, C.; Boyaval, P. Lipase and Esterase Activities of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*. **Applied and environmental microbiology**, v.59, n.12, p. 4004-4009, 1993.

Fennema, O.; R. **Introducción a La Ciencia de los Alimentos**. Barcelona: Reverté, 2000.

Freire, D.M.; Gomes, P.M.; Bon, E.P.S.; Lippel San't Anna Jr., G.L. Lipase production by a new promising strain *Penicillium restrictum*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.28, n.1, p.6-12, 1997.

Fu, D.; Yu, M.; Tan, T.; Zhou, X. Separation, characterization and catalytic properties of Lip2 isoforms from *Candida* sp. 99-125. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 115–121, 2009.

Ghanem, E.H.; Al-Sayed, H.A.; Saleh, K.M. An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. **World J Microbiol Biotechnol**, v.16, p. 459–464, 2000.

Ginalska, G.; Bancierz, R.; Kornilowicz-Kowalska, T. A thermostable lipase produced by a newly isolated *Geotrichum*-like strain, R59. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 31, p. 177–182, 2004.

Hasan, F.; Shah, A.A.; Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

Iyer, P.V.; Ananthanarayan, L. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1019–1032, 2008.

Kaushik, R.; Saran, S.; Isar, J.; Saxena, R.K. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p.121-126, 2006.

Kulkarni, N.; Gadre, R.V. Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2 W. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 28, p. 344–348, 2002.

Lima, V.M.G.; Mitchell, D.A.; Krieger, N. Caracterização cinética e bioquímica da lipase de *Bacillus megaterium*. In: XV **Simpósio Nacional de Fermentações**, Anais, Recife, p. 21-23, 2005.

Lotrakul, P.; Dharmsthiti, S. Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004. **Journal of Biotechnology**, vol. 54, n.2, p. 113-120, 1997.

Maldonado, R.R. **Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, 2006.

Mhetras, N.C. ; Bastawde, K.B. ; Gokhale, D.V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1486–1490, 2009.

Nawani, N.; Dosanjh, N.S.; Kaur, J. A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. **Biotechnol Lett**, v. 20, p. 997–1000, 1998.

Park, E.Y.; Sato, M.; Kojima, S. Fatty acid methyl ester production using lipase-immobilizing silica particles with different particle sizes and different specific surface areas. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 889–896, 2006.

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, 2003.

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

Razak, C.N.A.; Salleh, A.B.; Musan, R.; Samd, M.Y.; Basri, M. Some characteristics of lipases from thermophilic fungi isolated from palm oil mill effluent. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 3, n. 7, p. 1583-159, 1997.

Reshma, M.V.; Saritha, S.S.; Balachandran, C.; Arumughan, C. Lipase catalyzed interesterification of palm stearin and rice bran oil blends for preparation of zero trans shortening with bioactive phytochemicals. **Bioresour Technol.**, v. 99, n. 11, p.5011-5019, 2008.

Saisubramanian, N.; Edwinoliver, N.G.; Nandakumar, N.; Kamini, N.R.; Puvanakrishnan, R. Efficacy of lipase from *Aspergillus niger* as an additive in detergent formulations: a statistical approach. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 33, p. 669-676, 2006.

Salah, R.B.; Ghamghui, H.; Miled, N.; Mejdoub, H.; Gargouri, Y. Production of butyl Acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 368–372, 2007.

Santos, J. A.; Amaral, M. C. O.; Araújo, T. A. S.; Morais, K. G. C. Produção, extração e caracterização parcial de lipase extracelular de *Trichosporon sp* pelo sistema de duas fases aquosas PEG-sais fosfatos. In: **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Anais, Recife, p. 98-107, 2005.

Sharma , R.; Soni, S.K.; Vohra, R.M.; Gupta, L.K.; Gupta, J.K. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus sp.* RSJ-1. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1075–1084, 2002.

Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, Y. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, 19, 627-662, 2001.

Teng, Y.; Xu, Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3900-3907, 2008.

Wang, Y.; Li, X.; Liang, Y.; Yang, B.; Zhang, S. Enzymatic fractionation of conjugated linoleic acid isomers by selective esterification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 46, p. 20–25, 2007.

4.6. CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LIPASE PRODUZIDA POR *Aspergillus* sp O-8 VIA FERMENTAÇÃO SUBMERSA

4.6.1. RESUMO

*As lipases são enzimas que podem ser utilizadas em uma variedade de segmentos industriais, tais como indústrias de alimentos, farmacêutica, de detergentes e oleoquímica, no tratamento de efluentes, na síntese de surfactantes e na produção de biodiesel. A produção biotecnológica de enzimas requer a caracterização das mesmas, uma vez que as condições de produção influenciam as características finais e, portanto, suas aplicações. Dentre os fatores que influenciam a velocidade de reações enzimáticas, estão o pH e a temperatura. Objetivou-se caracterizar as lipases obtidas via fermentação submersa por *Aspergillus* sp (cepa O-8) quanto ao pH e temperatura ótimos para a obtenção da máxima atividade enzimática utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional. As temperaturas foram variadas de 28 a 42 °C e o pH de 6,3 a 7,7. As enzimas foram caracterizadas quanto à estabilidade a temperatura, congelamento e pH. As lipases apresentaram atividades máximas em temperatura de 37°C e pH 7,2, estabilidade ao congelamento a -20°C durante 90 dias, estabilidade térmica com manutenção de 72% de atividade residual em temperaturas de 70 a 90°C, estabilidade ao pH de 80 e 50% em pHs de 3,5 a 6,5 e 7 a 10, respectivamente, sendo estas características desejáveis para a aplicação industrial.*

*Palavras-chave: *Aspergillus*, fermentação submersa, caracterização bioquímica, lipases.*

4.6.2. ABSTRACT

*Lipases are enzymes which present applications in many areas such as food, pharmaceutical, oleochemical, detergents, in the treatment of effluents, synthesis of surfactants and in the production of biodiesel. The biotechnological production of lipases makes important the characterization of these enzymes, because the production conditions can influence the final characteristics of lipases, affecting their possible applications. Among the factors that can affect the rate of enzymatic reactions the pH and temperature can be cited. The aim of this work was to characterize partially the lipases obtained through submerged fermentation by *Aspergillus* sp - strain O-8 (isolated from a diesel oil contaminated soil) in relation to the optimal pH and temperature. A Central Composite Design was used, being tested temperatures from 28 to 42 °C and pH's from 6.3 to 7.7. The stability of lipases to temperature, pH and freezing was also determined. Lipases presented*

maximum activities at 37°C and pH 7.2, freezing stability at -20°C during 90 days, 80% of stability in pH's from 3.5 to 6.5 and 50% of stability in pH's from 7 to 10. With regard to temperature stability, the lipases maintained 72% of residual activity in temperatures from 70 to 90°C, being these good characteristics for industrial applications.

Key-words: lipases, submerged fermentation, Aspergillus, biochemical characterization

4.6.3. INTRODUÇÃO

As lipases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais (GAUR et al., 2008), apresentando aplicações em diversos segmentos, tais como as indústrias de alimentos, farmacêutica, de detergentes e oleoquímica (HASAN et al., 2006, SHARMA et al., 2001). Outras aplicações incluem o tratamento de efluentes (MENDES e CASTRO, 2005) a síntese de surfactantes (PAULA et al., 2005) e a produção de biodiesel (PARK et al, 2006, MACEDO e MACEDO, 2004).

Estas enzimas são classificadas como triacilglicerol-acil-hidrolases (E.C.3.1.1.3.) que atuam em ligações éster do grupo carboxílico. Podem catalisar a hidrólise de triglicerídios em diglicerídios, monoglicerídios e ácidos graxos livres e glicerol, além de reações de esterificação, interesterificação e transesterificação em meios não aquosos, acilação de mentóis e glicóis e síntese de peptídios (CARVALHO et al. 2003).

Pelas inúmeras aplicações industriais das lipases, há necessidade de estudar as características deste grupo enzimático, pois as lipases obtidas de diferentes fontes podem apresentar diferentes propriedades (MALDONADO, 2006), especialmente em relação à temperatura e ao pH ótimo de atuação.

A atividade ótima da enzima depende da integridade de sua estrutura primária, assim, condições que afetem esta condição, como pH, temperatura, agentes químicos, autólise (proteases) e força iônica afetam a máxima atividade da enzima (IYER e ANANTHANARAYAN, 2008). A temperatura apresenta efeito sobre a energia cinética das moléculas de enzimas e substratos, ocasionando um maior número de colisões produtivas por unidade de tempo. Uma absorção de excesso de energia pelas enzimas ocasiona o rompimento da estrutura terciária pelas modificações nas ligações do tipo pontes de hidrogênio, pontes dissulfeto e interações hidrofóbicas, havendo a desnaturação da estrutura protéica, o que resulta na inativação da atividade enzimática (GOMES et al., 2006). O pH afeta a estabilidade das enzimas por alterar as interações eletrostáticas da estrutura protéica, ocasionando modificações no estado de ionização dos aminoácidos, os quais definem as estruturas primária e secundária da proteína e por conseguinte, sua atividade e estabilidade (RAJAKUMARA et al., 2008; SHARMA et al. 2002).

Em vista da importância da caracterização das lipases obtidas de novas fontes a fim de vislumbrar a sua aplicabilidade, objetivou-se caracterizar as lipases obtidas por *Aspergillus* sp. (O-8) via fermentação submersa em função da temperatura e pH ótimos utilizando a metodologia de superfície de resposta, e determinar a estabilidade da enzima à temperatura e ao pH.

4.6.4. MATERIAL E MÉTODOS

4.6.4.1. Produção da enzima

O fungo filamentoso *Aspergillus* sp (cepa O-8) foi isolado de solo contaminado por óleo diesel (COLLA et al., 2009) e selecionado previamente como bom produtor de lipase via fermentação submersa. Após isolamento, o microrganismo foi mantido em tubos com ágar-batata-dextrose (ABD) inclinado sob refrigeração a 4 °C, sendo realizadas repicagens periódicas a cada 3 meses. O preparo do inóculo foi realizado através da inoculação dos fungos em placas de Petri contendo 30 mL de meio ABD solidificado e incubação a 30°C por 5 dias.

O meio de cultivo foi preparado utilizando-se 10% (m/v) de farelo de trigo, o qual foi submetido a cozimento a 100°C durante 30 min em 50% do volume total de água destilada. Após, o meio foi filtrado e adicionado de 10% (v/v) de solução salina, 45 g L⁻¹ de extrato de levedura como fonte de nitrogênio e 20 g L⁻¹ de óleo de soja como indutor. A solução salina continha 2 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 1 g L⁻¹ de MgSO₄ e 10 mL L⁻¹ de solução traço, a qual era composta por 0,63 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O, 0,01 mg L⁻¹ de MnSO₄ e 0,62 mg L⁻¹ de ZnSO₄ (BERTOLIN et al., 2001). O meio foi autoclavado e o pH do meio ajustado a 7,0 utilizando-se HCl 1,5 M ou NaOH 1 M. A inoculação dos meios foi realizada utilizando-se uma área circular de 20 mm de diâmetro do ABD contendo esporos do fungo. Após a inoculação, incubaram-se os cultivos durante 4 dias a 30°C com agitação de 160 min⁻¹. Estas condições de cultivo foram otimizadas previamente. O meio fermentado foi filtrado em algodão para a retenção das hifas e congelado a -20 °C até a utilização para a realização dos ensaios.

4.6.4.2. Efeito do pH e temperatura na atividade ótima da enzima

As condições experimentais para a verificação do efeito do pH e temperatura sobre a atividade lipolítica foram determinadas através de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) composto por 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 3 pontos centrais (Tabela 1).

A atividade enzimática foi determinada através do método padronizado por Burkert et al. (2004), o qual baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase presente no extrato enzimático sobre os triacilgliceróis do azeite de oliva emulsionados em goma arábica.

Em frascos de 250 mL adicionou-se 2 mL de tampão fosfato 0,2 M com pH pré-estabelecido no planejamento experimental, 5 mL de emulsão preparada com 75 mL de goma arábica a 7% e 25 mL de azeite de oliva. A este sistema adicionou-se 1 mL de extrato enzimático e incubou-se nas temperaturas previstas pelo planejamento experimental durante 30 min. Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de 15 mL de solução acetona:etanol:água (1:1:1) e titulou-se os ácidos graxos liberados com uma solução de NaOH 0,01 M utilizando fenolftaleína como indicador.

Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto por mL de extrato enzimático ($1\text{U} = 1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$), nas condições do ensaio.

4.6.4.3. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima

A estabilidade térmica da lipase foi determinada através da incubação dos extratos enzimáticos de 40 a 90°C, sendo retiradas alíquotas periodicamente para a determinação da atividade lipolítica, a qual foi realizada na temperatura e no pH ótimos para a atuação da enzima, segundo o método já descrito. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.6.4.4. Efeito do pH na estabilidade da enzima

O efeito do pH na estabilidade da enzima foi determinado pelo tratamento de 1 mL do extrato enzimático com 2 mL das soluções tampões em pH's 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 8,0 e 9,0. por 24 h a 25°C. Os tampões utilizados foram: citrato 0,1 M (pH 3,5), acetato 0,2 M (pHs 4,0 a 5,5), fosfato 0,2 M (pH's 6,0 a 8,0) e glicina 0,2 M (pH's 9 e 10). A atividade enzimática nos tempos inicial e final foi realizada na temperatura e no pH ótimos para a atuação da enzima, segundo o método já descrito. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.6.4.5. Estabilidade ao congelamento

O extrato enzimático foi utilizado para verificação da estabilidade ao congelamento. Periodicamente, a atividade lipolítica do extrato congelado foi determinada no pH e temperatura ótimos da enzima. As determinações foram realizadas em triplicata.

4.6.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.6.5.1. Ensaios de pH e temperatura ótimos

A Tabela 1 apresenta os níveis reais e codificados das variáveis pH e temperatura utilizados no DCCR e os resultados de atividade lipolítica. A variação do pH de 6,5 para 7,5 ocasionou um aumento na atividade lipolítica, o que pode ser verificado pelos resultados dos experimentos 1 e 2 (30°C), 3 e 4 (40°C) e 5 e 6 (35°C). O mesmo ocorreu quando o pH foi mantido constante e variou-se a temperatura de 30 para 40°C, nos experimentos 1 e 3 (pH 6,5), 2 e 4 (pH 7,5) e 7 e 8 (pH 7,0).

Tabela 1 Níveis reais e codificados das variáveis pH e temperatura utilizadas para a determinação da atividade lipolítica através do DCCR e resultados de atividade lipolítica (U) obtidos em cada experimento

| Experimento | pH (X ₁) | Temperatura (X ₂) | Atividade lipolítica (U) * |
|-------------|----------------------|-------------------------------|----------------------------|
| 1 | 6,5 (-1) | 30°C (-1) | 3,15 ± 0,13 |
| 2 | 7,5 (+1) | 30°C (-1) | 3,72 ± 0,01 |
| 3 | 6,5 (-1) | 40°C (+1) | 3,21 ± 0,07 |
| 4 | 7,5 (+1) | 40°C (+1) | 4,02 ± 0,08 |
| 5 | 6,3 (-α) | 35°C (0) | 3,54 ± 0,05 |
| 6 | 7,7 (+α) | 35°C (0) | 4,23 ± 0,02 |
| 7 | 7,0 (0) | 28°C (-α) | 3,82 ± 0,01 |
| 8 | 7,0 (0) | 42°C (+α) | 4,37 ± 0,03 |
| 9 | 7,0 (0) | 35°C (0) | 4,30 ± 0,12 |
| 10 | 7,0 (0) | 35°C (0) | 4,26 ± 0,01 |
| 11 | 7,0 (0) | 35°C (0) | 4,03 ± 0,03 |

*Resultados de média±desvio padrão. α=1,414

As máximas atividades lipolíticas (4,37 e 4,30 U) foram obtidas nos experimentos 8 (42°C e pH 7,0) e 9 (35°C e pH 7,0). Segundo Fu et al. (2009) um grande número de lipases fúngicas apresenta atividades máximas em temperaturas de 30 a 40°C e pH's 6 a 8. Resultados similares foram encontrados por Freire et al. (1997) e por Maldonado (2006), que relataram pH e temperatura ótimos de 7,0 e 37°C para as lipases produzidas por *Penicillium sp.*, *Geotrichum candidum*. Benjamin e Pandey (2000) relataram que lipases produzidas por *Candida rugosa* apresentaram atividade ótima em pH 7,0 e temperatura de 40°C. Pastore et al. (2003), que caracterizaram as lipases produzida por *Rhizopus sp.*,

encontraram máximas atividades em pH 6,0 e 6,5 e 40°C. Diaz et al. (2006) caracterizaram as lipases do fungo *Rhizopus homolhallicus*, produzidas em fermentações em estado sólido e submersa, e obtiveram atividades máximas em pH 7,5 entre 30 e 40 °C, respectivamente. Pokorny et al (1997) obtiveram máximas atividades das lipases de *Aspergillus niger* em pH 7,0 e 40°C.

A Tabela 2 apresenta a análise de variância dos dados de atividade lipolítica obtidos no Delineamento Composto Central Rotacional; e a Tabela 3, os efeitos estimados das variáveis sobre a atividade lipolítica. Verifica-se na Tabela 2 que o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi cerca de 2,26 vezes superior ao valor de F_{tabelado} , o que significa que a variação causada pelo modelo é significativamente maior que a variação não explicada (MURALIDHAR et al. 2001).

$$AL = 4,190 + 0,280.X_1 - 0,254.X_1^2 + 0,142.X_2 - 0,170.X_2^2 \quad (2)$$

Tabela 2 Análise de variância dos resultados de atividade lipolítica obtidos através dos experimentos do DCCR

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | $F_{\text{calculado}}$ | F_{tabelado} |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| Regressão | 2,452 | 5 | 0,4904 | 6,436751 | 2,852409 |
| Resíduos | 1,219 | 16 | 0,076188 | | |
| Total | 3,671 | 21 | 0,17481 | | |

Os efeitos estimados das variáveis (Tabela 3) demonstram que o pH apresentou efeitos linear e quadrático significativos ($p < 0,05$). A temperatura apresentou efeitos linear e quadrático de 0,057 e 0,054, respectivamente, sendo estes muito próximos a 0,05. Desta forma, o efeito da temperatura foi considerado para a expressão do modelo. Ambas variáveis apresentaram efeitos lineares positivos, sendo o efeito do pH superior ao efeito da temperatura (0,561 e 0,284 U, respectivamente). O modelo de regressão obtido encontra-se apresentado na Equação 2, sendo o coeficiente de correlação entre os dados experimentais e o modelo de 81,7%.

O cálculo do pH e temperatura ótimos para obtenção da máxima atividade lipolítica foi realizado igualando-se a primeira derivada da atividade lipolítica em função do pH e temperatura à zero. As máximas atividades lipolíticas foram obtidas no nível +0,55 para o pH e +0,417 para a temperatura, correspondendo ao pH de 7,2 e temperatura de 37 °C, o que também pode ser visualizado através da superfície de resposta apresentada na Figura 1.

Tabela 3 Efeitos estimados das variáveis sobre a atividade lipolítica nos experimentos do DCCR

| Fonte de variação | Efeitos estimados | t (16) | p (nível de significância) |
|--------------------------------|-------------------|--------|----------------------------|
| Média | 4,190 | 37,17 | <0,001 |
| X ₁ (L) | 0,561 | 4,06 | <0,001 |
| X ₁ (Q) | -0,508 | -3,09 | <0,001 |
| X ₂ (L) | 0,284 | 2,054 | 0,057 |
| X ₂ (Q) | -0,341 | -2,07 | 0,054 |
| X ₁ .X ₂ | 0,123 | 0,63 | 0,537 |

X₁: pH; X₂: Temperatura

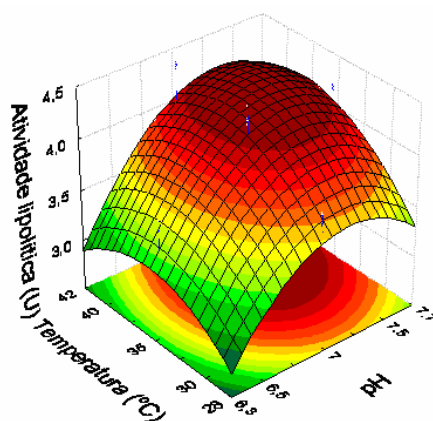


Figura 1 Superfície de resposta da influência do pH e temperatura sobre a atividade lipolítica das enzimas produzidas via fermentação submersa pelo fungo *Aspergillus* sp. a partir do DCCR

4.6.5.2. Estabilidade a temperatura

A estabilidade a temperatura das lipases produzidas via fermentação submersa pelo fungo *Aspergillus* sp (cepa O-8) foi avaliada primeiramente de 40 a 80°C, como demonstrado na Figura 2a. As enzimas apresentaram-se estáveis entre 40 e 50°C, com atividades residuais superiores a 90% durante 7 horas. Uma inativação inicial das enzimas entre 70 e 80°C foi observada e posteriormente as mesmas apresentaram-se estáveis, com atividades residuais de 80 e 65% a 80 e 70°C, respectivamente. As enzimas não apresentaram comportamento cinético de destruição térmica de primeira ordem (Arrhenius), além de apresentarem-se mais estáveis a 80°C do que a 70°C.

A fim de confirmar os dados obtidos, foram realizados ensaios a 70, 80 e 90°C, durante 8 h, sendo os resultados apresentados na Figura 2b, confirmando o comportamento anteriormente citado, com uma inativação inicial da enzima, ocasionada pelo choque térmico, e posterior estabilidade. Além disso, as enzimas apresentaram maior estabilidade nas maiores temperaturas na primeira hora de ensaio. As lipases apresentaram-se estáveis de 70 a 90°C, com atividades residuais médias em torno de 72% após a primeira hora de incubação.

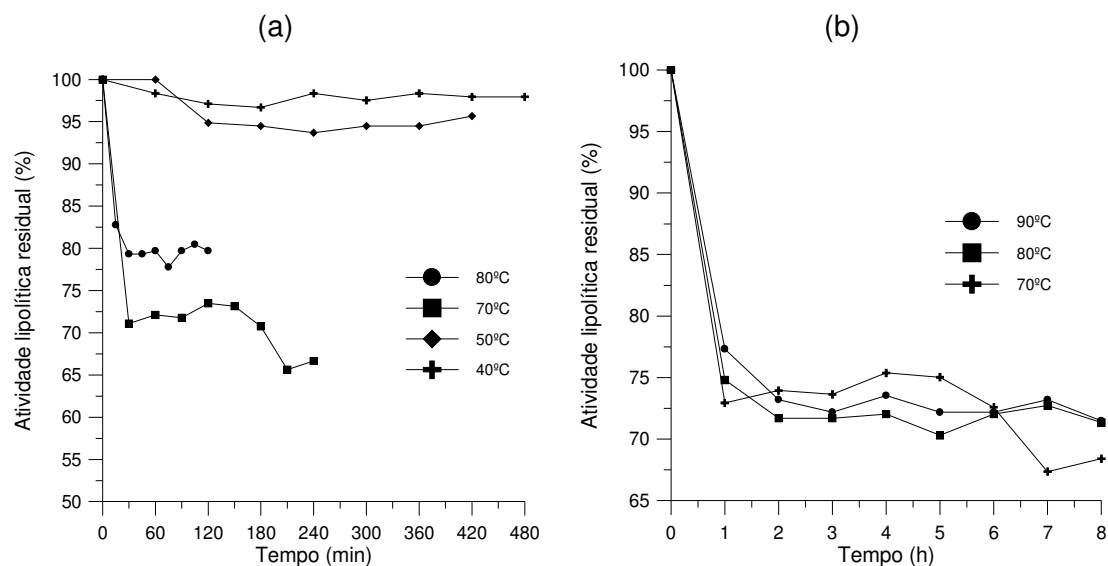


Figura 2 Estabilidade térmica das lipases produzidas pelo fungo *Aspergillus* sp. (cepa O-8) via fermentação submersa: a) temperaturas de 40°C, 50°C, 70°C e 80°C; b) temperaturas de 70°C, 80°C e 90°C

Segundo Razak et al. (1997) a maioria das lipases fúngicas não apresentam estabilidade térmica acima de 40°C. Shu et al. (2006) relataram que as lipases produzidas por *Antrodia cinnamomea* apresentaram 50% de atividade residual entre 25 e 40°C. A lipase de *Aspergillus niger* NCIM 1207 apresentou estabilidade a 40°C durante 3 h, entretanto o tratamento a 50°C durante 1 h ocasionou 52% de perda de atividade (MHETRAS et al., 2009). Baron et al. (2005) demonstraram que as lipases produzidas por *Penicillium corylophilum* foram totalmente inativadas após 30 min a 60°C. Já as lipases obtidas por *Rhizopus* sp apresentaram termoestabilidade moderada, com 70% de atividade residual em temperaturas de 40°C a 55°C (PASTORE et al., 2003). Em comparação com as lipases produzidas pela bactéria *Bacillus megaterium*, as lipases fúngicas citadas apresentaram baixa termoestabilidade, uma vez que esta enzima apresentou 50% de atividade residual nas condições de 50°C por 86 min, 60°C por 7,7 min e 70°C por 1,2 min (LIMA et al., 2005). Entretanto, Ginalska et al. (2004) demonstrou que as lipases produzidas por *Geotrichum* sp apresentaram 100% de atividade residual após 1 hora de incubação a 60°C, e 50% de

atividade residual a 70°C por 45 min. Ainda, Sharma et al. (2002) relataram que a lipase produzida por *Bacillus sp.* RSJ-1 apresentou 90 e 70% de atividade residual após tratamento a 50°C durante 120 e 240 min, respectivamente.

Em comparação com as enzimas citadas, as lipases obtidas neste trabalho apresentaram maior termoestabilidade, podendo apresentar aplicações industriais em processos que requeiram elevadas temperaturas de processo. Os processos enzimáticos que ocorrem em temperaturas superiores apresentam maiores taxas de reação (IYER e ANANTHANARAYAN, 2008). As lipases termoestáveis podem apresentar aplicação na síntese de biopolímeros, fármacos, agroquímicos, cosméticos, biodiesel e aromas (HORCHANI et al., 2009).

As condições da produção das enzimas podem afetar sua termoestabilidade, tais como o microrganismo produtor, o modo de cultivo e o meio utilizado. Maldonado (2006) demonstrou a variação da termoestabilidade de lipases produzidas em diferentes meios de cultivo. A termoestabilidade é o resultado da sequência de aminoácidos da proteína, o que confere uma conformação mais rígida à enzima (IYER e ANANTHANARAYAN, 2008), através de interações intramoleculares, com internalização de resíduos hidrofóbicos e exposição superficial dos resíduos hidrofílicos (MHETRAS et al., 2009).

A termoestabilidade de lipases pode ainda ser afetada pela presença de compostos como álcoois de cadeia curta, metais e íons. A presença de Ca^{+2} e Mg^{+2} aumentam a termoestabilidade devido ao impedimento da desnaturação por hidratação do sítio catalítico, resultando em um rearranjo de cargas e complexação com Ca^{+2} . Isto ocorre porque a água de hidratação do cálcio é liberada quando este se liga à proteína, ocasionando o favorecimento do processo em elevadas temperaturas. Estes íons ligam-se na superfície das enzimas cujos sítios de ligação são geralmente formados por grupos carregados negativamente (CHAKRABORTY e RAJ, 2008). Segundo Iyer e Ananthanarayan (2008) a estabilização térmica de lipases pode ser ocasionada pela presença de íons divalentes, ânions (SO_4^{-2} > Cl^- > Br^- > NO_3^- > ClO_4^-) ou cátions (NH_4^+ > K^+ > Na^+ > Mg^{+2} > Ca^{+2} > Ba^{+2}). Dos compostos citados, encontravam-se presentes no meio de cultivo para a produção das lipases o Mg^{+2} e o SO_4^{-2} , os quais se não consumidos pelo fungo para crescimento e síntese, permaneceram solúveis após a separação das células, compondo o extrato lipolítico, o que poderia justificar a termoestabilidade das enzimas produzidas.

4.6.5.3. Estabilidade ao congelamento

A estabilidade das enzimas a baixas temperaturas é um fator importante. Neste sentido, as lipases utilizadas nesta pesquisa apresentaram estabilidade ao congelamento a -20°C durante 90 dias, com atividades residuais superiores a 80% (Figura 3).

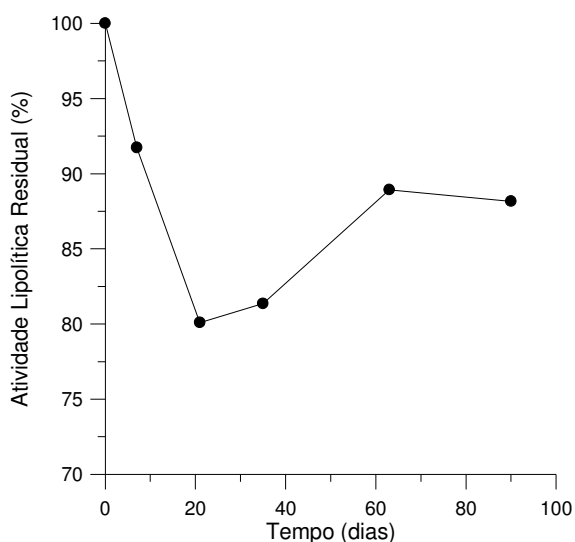


Figura 3 Estabilidade das lipases produzidas por *Aspergillus sp* (O-8) em fermentação submersa na estocagem sob congelamento a -20°C.

4.6.5.4. Estabilidade ao pH

As lipases apresentaram-se estáveis em pH's de 3,5 a 6,5, durante 24 h, com atividades residuais superiores a 80%. Em pHs de 7 a 10 houve uma redução na estabilidade das enzimas, com atividades residuais em torno de 50%, conforme demonstrado na Figura 4.

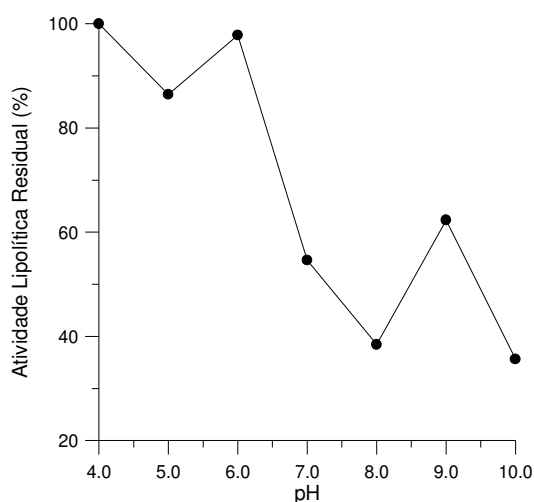


Figura 4 Estabilidade ao pH das lipases produzidas pelo fungo *Aspergillus sp* (cepa O-8) via fermentação submersa

Mhetras et al. (2009) relataram que as lipases produzidas por *Aspergillus niger* NCIM 1207 apresentaram estabilidade em pH alcalino (8 a 11) embora tenham apresentado atividades ótimas em pH's ácidos. Sharma et al. (2002), para as lipases produzidas por *Bacillus sp.* RSJ-1, relataram que as mesmas apresentaram 84 e 82% de atividade residual,

respectivamente, após 2 h em pH's 8 e 9, com perda de 96% de atividade em pH 12. Fu et al. (2009) caracterizaram as enzimas produzidas por *Candida* sp 99-125 e relataram que as mesmas foram estáveis em pH's de 7,5 a 8,5 durante 15 min.

4.6.6. CONCLUSÃO

As lipases produzidas pelo fungo *Aspergillus* sp (cepa O-8) apresentaram atividades máximas a 37°C e pH 7,2. A estabilidade térmica foi de 72% após 1 h de exposição em temperaturas de 70 a 90°C e a estabilidade ao pH superior a 80 % em pHs ácidos, sendo estas características desejáveis para a aplicação industrial.

Agradecimentos: ao CNPq pelo apoio financeiro.

4.6.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baron, A.M.; Turra, V.M.Z.; Mitchell, D.A.; Krieger, N. Produção e caracterização de lipases *Penicillium corylophilum* IOC 4211. In: XV **Simpósio Nacional de Fermentações**, Anais, Recife, p. 30-35, 2005.

Benjamin, S.; Pandey, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.44, n.2, p. 213-221, 2000.

Bertolin et al., T.E.; Costa, J.A.V.; Pasquali, G.D.L. Glucoamylase production in batch and fed-batch solid state fermentation: effect of maltose or starch addition. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 13-16, 2001.

Burkert, J.F.M.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 77-84, 2004.

Carvalho, P.O.; Campos, P.R.B.; Noffs, M.D.; Oliveira, J.G.; Shimizu, M. T.; Silva, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v.26, n.1, p. 22-24, 2003.

Colla, L.M.; Rezzadori, K.; Câmara, S.K.; Debon, J.; Tibolla, M.; Bertolin et al., T.E.; Costa, J.A.V. A solid-state bioprocess for selecting lipase producing filamentous fungi. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 64C, p. 131-137, 2009.

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

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

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, n. 5, p. 1042-1050, 2006.

Freire, D.M.; Gomes, P.M.; Bon, E.P.S.; Lippel San't Anna Jr., G.L. Lipase production by a new promising strain *Penicillium restrictum*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.28, n.1, p.6-12, 1997.

Fu, D.; Yu, M.; Tan, T.; Zhou, X. Separation, characterization and catalytic properties of Lip2 isoforms from *Candida* sp. 99-125. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 115–121, 2009.

Gaur, R.; Gupta, A.; Khare, S.K. Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1040–104, 2008.

Ginalska, G.; Bancercz, R.; Kornilowicz-Kowalska, T. A thermostable lipase produced by a newly isolated *Geotrichum*-like strain, R59. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 31, p. 177–182, 2004.

Gomes, F.M.; De Paula, A.V.; Silva, G.S.; Castro, H.F. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Química Nova**, v. 29, n.4, p. 710-718, 2006.

Hasan, F.; Shah, A.A.; Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

Horchani, H.; Mosbah, H.; Salem, N.B.; Gargouri, Y.; Sayari, A. Biochemical and molecular characterisation of a thermoactive, alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 4, p. 237-245, 2009.

Iyer, P.V.; Ananthanarayan, L. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1019–1032, 2008.

Lima, V.M.G.; Mitchell, D.A.; Krieger, N. Caracterização cinética e bioquímica da lipase de *Bacillus megaterium*. In: XV **Simpósio Nacional de Fermentações**, Anais, Recife, p. 21-23, 2005.

Macedo, G.A.; Macedo, J. A. Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 32, p. 38-46, 2004.

Maldonado, R.R. **Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, 2006.

Mendes, A.A; Castro, H.F.. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v.28, n. 2, p. 296 – 305, 2005.

Mhetras, N.C. ; Bastawde, K.B. ; Gokhale, D.V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1486–1490, 2009.

Muralidhar, R.V.; Chirumamila, R.R.; Marchant, R.; Nigam, P. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, p. 17-23, 2001.

Park, E.Y.; Sato, M.; Kojima, S. Fatty acid methyl ester production using lipase-immobilizing silica particles with different particle sizes and different specific surface areas. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 889–896, 2006.

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, 2003.

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

Razak, C.N.A.; Salleh, A.B.; Musan, R.; Samd, M.Y.; Basri, M. Some characteristics of lipases from thermophilic fungi isolated from palm oil mill effluent. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 3, n. 7, p. 1583-159, 1997.

Rajakumara, E.; Acharya, P.; Ahmad, S.; Sankaranaryanan, R.; Rao, N.M. Structural basis for the remarkable stability of *Bacillus subtilis* lipase (Lip A) at low pH. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 302–311, 2008.

Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, Y. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, 19, 627-662, 2001.

Sharma , R.; Soni, S.K.; Vohra, R.M.; Gupta, L.K.; Gupta, J.K. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1075–1084, 2002.

Shu, S.H.; Xu, C.J.; Lin, G.C. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. **Process Biochemistry**, v.4, n. 3, p. 734-738, 2006.

4.7. PRODUÇÃO SIMULTANEA DE LIPASES E BIOSURFACTANTES ATRAVÉS DE FERMENTAÇÕES SUBMERSA E EM ESTADO SÓLIDO

4.7.1. RESUMO

*As lipases e os biosurfactantes são compostos produzidos por microrganismos e que estão associados com a metabolização de substratos oleosos. Devido as aplicações destes biocompostos em vários setores industriais, como nas indústrias alimentícias, química, farmacêutica e petrolífera, o estudo de métodos de produção bem como a seleção de novas cepas produtoras é premente. Apesar de ambos metabólitos serem produzidos pelos microrganismos, a relação entre a produção de lipases e biosurfactantes não se encontra estabelecida. O objetivo deste trabalho foi estudar a existência de correlação entre a produção de lipases e biosurfactantes através de fermentações submersa e em estado sólido utilizando-se duas cepas de *Aspergillus spp.* (O-4 e O-8, respectivamente) isoladas de solo contaminado com óleo diesel. A produção de lipases e biosurfactante em fermentação em estado sólido foi realizada utilizando-se farelo de soja e casca de arroz, 60% de umidade, 2% de nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, 2% de azeite de oliva como indutor, pH 4,5 e o fungo *Aspergillus sp.* O-4. Na fermentação submersa, o meio foi composto de farelo de trigo, 4,5% de extrato de levedura como fonte de nitrogênio, 2% de óleo de soja como indutor, agitação de 120 min^{-1} , pH 7,15 e o fungo *Aspergillus sp.* O-8. A maior produção de lipases foi obtida na fermentação em estado sólido, com atividades lipolíticas de 25,22 U comparado com 4,52 U na fermentação submersa, entretanto, não foi observada a produção de biosurfactantes. A produção de lipases foi simultânea ao aumento da atividade emulsificante na fermentação submersa, obtendo-se atividades lipolíticas de 4,52 U e atividades emulsificantes O/A e A/O de 2,95 and 42 UE, respectivamente. As correlações entre a produção de lipases e as atividades emulsificantes O/A e A/O foram de 95,4 e 86,8%, respectivamente. A redução da tensão superficial dos meios foi de 50 para 28 mN m^{-1} , sendo observada também a atividade antimicrobiana dos extratos, com potenciais antimicrobianos frente ao *S. aureus* ATCC 25923 de 36 e 43%, indicando a produção de biosurfactantes pelo *Aspergillus sp.* O-8.*

Palavras-chave: Aspergillus spp., fermentação submersa, fermentação em estado sólido, biosurfactantes, lipases.

4.7.2. ABSTRACT

Lipases and biosurfactants are compounds produced by microorganisms in general associated with oil substrates metabolization. Due to the applications of these compounds in many industrial sectors, as food, chemical, farmaceutical and petroleum industries, the study of production methods, as well as the screening of new producing strains are very important. Besides the both metabolites being produced by microorganisms, the relationship between the production of lipases and biosurfactants are not established. The aim of this work was to evaluate the correlation of lipases and biosurfactants production throught solid-state and submerged process using two strains of Aspergillus spp. (O-4 e O-8, respectively), isolated of diesel oil contaminated soil. The production of lipases and biosurfactants in solid-state bioprocess were made using soy bran and rice husk, humidity of 60%, 2% of sodium nitrate as nitrogen source, 2% of olive oil as inductor, pH 4.5 and the fungi Aspergillus sp. O-4. In the submerged bioprocess, the medium was composed by wheat bran, 4.5% of yeast extract as nitrogen source, 2% of soy oil as inductor, agitation of 120 min⁻¹, pH 7.15 and the fungi Aspergillus sp. O-8. Solid-state bioprocess obtained the highest production of lipases, with lipolitic activities of 25.22 U comparing to 4.52 U in the submerged bioprocess, however, the production of biosurfactants was not observed in the first production mode. The production of lipases in submerged bioprocess was simultaneous with the increase of emulsifier activity, being obtained maximal lipolitic activities of 4.52 U and maximal emulsifier activities O/A and A/O of 2.95 and 42 UE, respectively. Corelation coefficients of 95,4 and 86,8% were obtained between the production of lipases and the O/A and A/O emulsifier activities, respectively. The extracts of submerged bioprocess presented reduction of superficial tension of 50 to 28 mN m⁻¹ and antimicrobial activities of 36 and 46% against S. aureus ATCC 25923, these results indicating the biosurfactants production in the culture medium.

Key-words: Aspergillus spp., biosurfactants, lipases, submerged and solid-state bioprocess

4.7.3. INTRODUÇÃO

As lipases (triacilglicerol-acilhidrolases) são enzimas que catalisam diversas reações, tais como a reação de hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis, além de reações de esterificação, transesterificação e interesterificação de lipídios. Por este motivo, são aplicáveis em uma diversidade de setores industriais, em especial, na indústria química, na produção de surfactantes, detergentes ou na resolução de misturas racêmicas (YU et al., 2008; SAISUBRAMANIAN et al., 2006; RAO et al., 1993), no tratamento de resíduos ricos

em óleos e gorduras (LEAL et al., 2002) e na área da saúde, compondo medicamentos, em diagnósticos, cosméticos ou antibióticos (HASAN et al., 2006).

Na indústria de alimentos, as lipases apresentam aplicações na síntese de emulsificantes como os mono e diacilgliceróis (KITTIKUN et al., 2008; KIM et al., 2006), na produção de lipídios com elevados teores de ácidos graxos poliinsaturados (RESHMA et al., 2008, WANG et al., 2007); no desenvolvimento de aromas (SALAH et al., 2007); na maturação de queijos (DUPUIS et al., 1993) e embutidos cárneos, entre outros. Apresentam, ainda, importante aplicação no setor de bioenergia, em especial na produção de biodiesel (PARK et al., 2006), setor em expansão, dada à preocupação mundial com a utilização energias renováveis devido aos crescentes esforços com os cuidados ao meio ambiente.

Os biossurfactantes são compostos produzidos por microrganismos caracterizados quimicamente como glicolipídios, lipopeptídios, ácidos graxos, fosfolipídios, lipídios neutros ou lipopolissacarídios (DESAI e BANAT, 1997).

Na indústria de alimentos, a principal aplicação dos biossurfactantes é a formação de emulsões. Outras possíveis aplicações incluem a estabilização de sistemas aerados, a modificação das propriedades reológicas, a melhoria da consistência e textura de produtos contendo amido e gordura, bem as propriedades antimicrobianas que tornam estes compostos importantes para o controle de microrganismos patogênicos nas superfícies de contato dos alimentos, evitando a formação de biofilmes (NITSCHKE e COSTA, 2007).

As vantagens que estes compostos oferecem são baixa toxicidade, biodegradabilidade, aceitabilidade ecológica, estabilidade e funcionalidade sob diversas condições extremas de pH e temperatura (VAN DYKE et al., 1991). A possibilidade de produção a partir de resíduos agroindustriais também tem sido citada como vantagem compostos (NITSCHKE e PASTORE, 2003), havendo relatos de produção a partir de resíduos como melaço (JOSHI et al., 2008), soro de queijo (RODRIGUES et al., 2006a), óleo lubrificante e torta de amendoim (THAVASI et al., 2007).

As fermentações submersa e em estado sólido têm sido relatadas como métodos de produção biotecnológica de lipases e biossurfactantes. Na fermentação em estado sólido os microrganismos crescem na superfície e no interior de partículas porosas úmidas (COUTO e SANROMÁN, 2005; PANDEY, 2003), enquanto que na fermentação submersa os microrganismos encontram-se suspensos em um meio líquido contendo os nutrientes dissolvidos (SCHMIDELL et al., 2001). A fermentação em estado sólido apresenta como vantagens a economia gerada pelos menores espaços necessários para o bioprocessamento, a possibilidade de utilização de substratos de baixo custo, a utilização de equipamentos, maquinário e controles mais simples, maiores rendimentos, menores volumes de água utilizados e menor demanda energética (LONSANE et al., 1985). A fermentação submersa apresenta as vantagens de maior homogeneidade do meio de cultivo e a facilidade de

controle de parâmetros como a temperatura e o pH (PANDEY et al., 2000), além de serem os bioprocessos mais utilizados mundialmente e por isso, existirem mais informações acerca da engenharia dos processos e controles. Os bioprocessos submersos apresentam a dificuldade de transferência de oxigênio nos meios líquidos, enquanto que a transferência de calor é o principal problema associado à fermentação em estado sólido (SCHMIDELL et al., 2001).

A síntese de lipases e biossurfactantes por microrganismos pode ocorrer pela necessidade dos microrganismos de metabolizar compostos insolúveis em água (DESAI e BANAT, 1997; KOSARIC e CAIRNS, 1987). Os biossurfactantes são compostos produzidos por reações de metabolismo secundário apresentando funções como a motilidade e adesão celular, diferenciação, acessibilidade aos substratos e como moléculas de armazenamento de carbono e energia (VAN HAMME et al., 2006). Embora os biossurfactantes possam ser produzidos via síntese orgânica através de reações catalisadas por lipases (PAULA et al., 2005; TARAHOMJOO e ALEMZADEH, 2003), pela esterificação de ácidos graxos e açúcares, a correlação entre a produção de lipases e biossurfactantes nos processos fermentativos não se encontra estabelecida. O objetivo deste trabalho foi verificar a existência de correlação entre a produção de lipases e biossurfactantes em fermentação submersa e em estado sólido através de *Aspergillus* spp.

4.7.4. MATERIAL E MÉTODOS

4.7.4.1. Microrganismos, manutenção e preparo do inóculo

Duas cepas de *Aspergillus* sp. (O-8 e O-4), foram isoladas de solo contaminado por óleo diesel e selecionadas como boas produtoras de lipases via fermentação submersa e em estado sólido, respectivamente.

Após isolamento, os microrganismos foram mantidos em tubos com ágar-batata-dextrose (ABD) inclinado sob refrigeração a 4°C, sendo realizadas repicagens periódicas a cada 3 meses. O preparo do inóculo para as fermentações foi realizado através da inoculação dos fungos em placas de Petri contendo 30 mL de meio ABD solidificado e incubação a 30°C por 5 dias.

4.7.4.2. Produção de lipases e biossurfactantes via fermentação submersa

O meio de cultivo foi preparado utilizando-se 10% (m/v) de farelo de trigo, o qual foi submetido a cozimento a 100°C durante 30 min em 50% do volume total de água destilada. Após, o meio foi filtrado e adicionado de 10% (v/v) de solução salina, 45 g.L⁻¹ de extrato de

levedura e 20 g.L⁻¹ de óleo de soja como indutor. A solução salina continha 2 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, g.L⁻¹ de MgSO₄ e 10 mL L⁻¹ de solução traço, a qual era composta por 0,63 mg.L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O, 0,01 mg.L⁻¹ de MnSO₄ e 0,62 mg.L⁻¹ de ZnSO₄ (BERTOLIN et al., 2001). O meio líquido foi autoclavado e o pH do meio ajustado a 7,0 utilizando-se soluções de HCl 1,5 M ou NaOH 1 M.

A produção dos biocompostos foi realizada em erlenmeyers de 250 mL com volume inicial de meio de 100 mL, num total de 14 experimentos. A inoculação dos meios foi realizada utilizando como inoculo uma área circular de 20 mm de diâmetro de ABD contendo esporos do fungo O-8. Após a inoculação, os cultivos foram incubados durante 7 dias a 30°C com agitação de 120 min⁻¹. A cada 24 h foi interrompida a fermentação em 2 erlenmeyers e os meios utilizados para as determinações analíticas.

4.7.4.3. Produção de lipases e biossurfactantes via fermentação em estado sólido

O meio de cultivo para a fermentação em estado sólido foi preparado com 85,7% de farelo de soja e 14,3% de casca de arroz, utilizada para aumentar a porosidade do meio e facilitar a transferência de oxigênio. O meio foi adicionado de 71% (v/p) de solução salina (2 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, g L⁻¹ de MgSO₄ e 10 mL L⁻¹ de solução traço, a qual era composta por 0,63 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O, 0,01 mg L⁻¹ de MnSO₄ e 0,62 mg L⁻¹ de ZnSO₄ e água destilada até o volume de 1 L), a fim de fornecer micronutrientes (BERTOLIN et al., 2001). O meio de cultivo foi autoclavado a 103 kPa por 20 min, sendo posteriormente adicionado de 2% de azeite de oliva e 2% de nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. O pH foi corrigido até 4,5 a partir da adição de uma solução 1,5 M de H₂SO₄ e a umidade foi ajustada até 60% pela adição de água destilada estéril.

Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 300 mL contendo 50 g de meio e inoculados com 2,5 mL de uma suspensão de esporos a fim de obter-se uma concentração inicial de esporos no meio de cultivo de 2.10⁶ esporos g⁻¹. Foram incubados 14 erlenmeyers a 30°C, sendo a cada 48 h interrompida a fermentação em dois erlenmeyers e os farelos utilizados para as determinações analíticas.

4.7.4.4. Determinações analíticas

4.7.4.4.1. Obtenção dos extratos

Os meios da fermentação submersa foram centrifugados para a separação das células fúngicas e os extratos obtidos utilizados para as determinações analíticas.

Os farelos da fermentação em estado sólido foram submetidos à extração para a determinação das atividades lipolíticas e emulsificantes. Para a determinação da atividade lipolítica, 1 g de farelo fermentado foi extraído com 10 mL de solução tampão fosfato 0,2 M pH 7,0 em banho-maria a 160 min^{-1} durante 30 min a 37°C , com posterior filtração para separação dos sólidos. Para a determinação da atividade emulsificante, 5 g de farelo fermentado foram extraídos com 30 mL de água destilada a 90°C seguido de extração em banho-maria a 50°C durante 30 min, com posterior filtração e centrifugação para a separação dos sólidos e esporos.

4.7.4.4.2. Estimativa do crescimento fúngico

Os meios da fermentação submersa foram centrifugados para separação dos sólidos. O sobrenadante foi separado para a determinação de lipases e biossurfactantes e os sólidos foram adicionados em cápsulas de alumínio taradas e secas em estufa a 70°C durante 24 h para a determinação da concentração celular (g L^{-1}).

Os farelos obtidos durante a fermentação em estado sólido foram submetidos à determinação de proteínas por Kjeldhal (A.O.A.C., 1995) a fim de estimar o crescimento fúngico.

4.7.4.4.3. Determinação da atividade lipolítica (AL)

Na determinação da AL foi adotado o método descrito por Burkert et al. (2004), o qual se baseia na titulação com NaOH 0,01 M dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase, presente no extrato enzimático, sobre os triacilgliceróis do azeite de oliva emulsionados em goma arábica.

4.7.4.4.4. Determinação da atividade emulsificante

As atividades emulsificantes óleo em água e água em óleo foram determinadas segundo metodologia proposta por MARTINS et al. (2006), utilizando-se 3,5 mL de extrato e 2 mL de óleo de soja. A mistura foi agitada em agitador vórtex a 700 min^{-1} por 1 min. Após 60 min de repouso foi lida a absorvância do meio emulsificado óleo/água em espectrofotômetro a 610 nm. A leitura foi realizada diminuindo-se da absorvância do branco, obtida a partir da leitura da amostra. Dessa forma, obteve-se a atividade emulsificante óleo em água através da Equação 1. Após 24 h de repouso foi realizada a leitura da altura da emulsão água/óleo formada e da altura total (altura da emulsão mais altura da camada remanescente de óleo), gerando a atividade emulsificante água em óleo de acordo com a

Equação 2. Dois brancos foram realizados, utilizando água no lugar da amostra e os extratos obtidos a partir dos meios de cultivo não fermentados.

$$AE_{O/A} = (ABS_{amostra} - ABS_{branco}).D \quad (1)$$

$$AE_{A/O} = (E_{amostra} - E_{branco}).D \quad (2)$$

Onde:

AE = atividade emulsificante (UE);

O/A = óleo em água;

A/O = água em óleo;

ABS = absorvância;

E = relação centesimal entre a altura da emulsão água/óleo e a altura total;

D = diluição da amostra em água.

4.7.4.4.5. Determinação da tensão superficial

Os extratos obtidos durante a fermentação submersa foram utilizados para a determinação da tensão superficial em tensiômetro (Kruss Processor Tensiometer K-6, Alemanha) usando o método do anel, sendo a tensão medida com a amostra em contato com o ar (COSTA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006b). Neste método, um recipiente contendo a amostra a ser analisada é suspensa até que o contato com a superfície do anel seja registrado. O contato da amostra com o anel é desfeito, de maneira que o filme líquido produzido abaixo do anel é alongado, sendo determinada a força máxima necessária para a extensão do filme, obtendo-se a tensão superficial (RODRIGUES et al., 2006b).

4.7.4.4.6. Determinação da atividade antimicrobiana

O potencial antimicrobiano dos extratos obtidos durante a fermentação submersa foi determinado utilizando-se como microrganismo indicador o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A cepa foi repicada em 50 mL de meio BHI (Infusão cérebro coração) estéril e incubada por 24 h. A suspensão de microrganismos obtida foi diluída com BHI estéril até que apresentasse absorvância 0,20 em comprimento de onda 610 nm. Em tubos de ensaio estéreis, adicionaram-se 4 mL da suspensão diluída do *S. aureus* e 1 mL do extrato da fermentação previamente esterilizado. Os tubos foram incubados a 37°C durante 12 h, sendo lida a absorvância a 610 nm a cada hora. Foram realizadas triplicatas do ensaio para cada extrato obtido durante o processo fermentativo. Como controles, foram realizados dois

ensaios: a) 3 tubos contendo 4 mL de suspensão do microrganismo e 1 mL de meio de cultivo não fermentado e b) 3 tubos contendo 4 mL de BHI estéril e 1 mL de água destilada estéril. Os dados de absorvância versus tempo foram utilizados para o cálculo do potencial antimicrobiano (PA), conforme a Equação 3.

$$PA(\%) = \frac{ABS_{controle} - ABS_{extrato}}{ABS_{controle}} \cdot 100 \quad (3)$$

4.7.5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.7.5.1. Produção de lipases e atividades emulsificantes em fermentação submersa e em estado sólido

A Tabela 1 apresenta os resultados de atividade lipolítica, das atividades emulsificantes óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O) e do crescimento fúngico para os fermentações submersa e em estado sólido utilizando os fungos *Aspergillus* spp., cepas O-8 e O-4, respectivamente.

Tabela 1 Atividade lipolítica (U), atividade emulsificante óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O) (UE) e crescimento fúngico (g/L e % proteínas) obtidos através de fermentação submersa e em estado sólido através de *Aspergillus* sp (cepas O-8 e O-4)

| Fermentação submersa | | | | |
|------------------------------|--------------|-------------|--------------|---------------|
| Tempo (d) | AL (U) | AE O/A (UE) | AE A/O (UE) | X (g/L) |
| 0 | 2,82 ± 0,13 | 0,90 ± 0,02 | 1,73 ± 0,35 | 1,79 ± 0,18 |
| 1 | 3,21 ± 0,09 | 0,96 ± 0,05 | 22,52 ± 5,23 | 2,57 ± 0,08 |
| 2 | 3,48 ± 0,18 | 0,61 ± 0,07 | 30,56 ± 0,21 | 4,49 ± 0,03 |
| 3 | 3,79 ± 0,07 | 1,76 ± 0,25 | 42,67 ± 6,65 | 3,06 ± 0,02 |
| 4 | 4,52 ± 0,04 | 2,95 ± 0,18 | 14,40 ± 2,90 | 4,19 ± 1,54 |
| 5 | 3,56 ± 0,08 | 0,32 ± 0,12 | 21,26 ± 0,91 | 3,64 ± 0,59 |
| 6 | 3,71 ± 0,04 | 1,19 ± 0,15 | 22,12 ± 9,07 | 3,13 ± 1,13 |
| Fermentação em estado sólido | | | | |
| Tempo (d) | AL (U) | AE O/A (UE) | AE A/O (UE) | Proteínas (%) |
| 0 | 16,96 ± 0,19 | 0,52 ± 0,20 | 0,29 ± 0,14 | 13,34 ± 0,01 |
| 2 | 20,67 ± 0,21 | 0,43 ± 0,07 | 1,26 ± 2,25 | 14,76 ± 0,43 |
| 4 | 25,22 ± 0,49 | 1,79 ± 0,05 | 1,38 ± 0,14 | 16,76 ± 0,39 |
| 6 | 24,09 ± 0,37 | 1,92 ± 0,13 | 1,45 ± 1,56 | 18,37 ± 1,65 |
| 8 | 21,91 ± 0,19 | 2,01 ± 0,05 | 1,19 ± 0,32 | 19,52 ± 0,51 |
| 10 | 14,20 ± 0,10 | 1,18 ± 0,26 | 0,65 ± 0,11 | 20,21 ± 0,07 |
| 12 | 11,58 ± 0,41 | 0,68 ± 0,01 | 0,00 ± 0,00 | 15,74 ± 1,62 |

Através da fermentação submersa (*Aspergillus* sp. O-8) verificou-se que a máxima atividade lipolítica foi 4,52 U, em 4 dias de cultivo. A produção de lipases foi concomitante

ao aumento da atividade emulsificante O/A com máximo de 2,95 UE. Já a atividade emulsificante A/O teve seu pico em 3 dias de cultivo, com 42,7 UE.

Na fermentação em estado sólido (*Aspergillus* O-4), as máximas atividades lipolítica e emulsificante ocorreram entre 4 e 8 dias de cultivo. A máxima atividade lipolítica, de 25,22 U, ocorreu em 4 dias de fermentação. A atividade emulsificante O/A na fermentação em estado sólido foi 2,01 UE, em comparação com 2,95 UE para a fermentação submersa. Enquanto as emulsões A/O formadas com os extratos da fermentação submersa apresentaram estabilidade após 24 h, com máxima atividade emulsificante de 42,67 UE (correspondente a 42% de camada emulsificada), na fermentação em estado sólido as emulsões formadas foram instáveis após 24 h, sendo a máxima atividade 1,45 UE.

As maiores atividades lipolíticas obtidas na fermentação em estado sólido podem estar relacionadas às características deste modo de cultivo em comparação com o cultivo submerso, onde o produto final encontra-se concentrado (SCHMIDELL et al., 2001) e ainda devido as características apropriadas dos fungos para sua utilização nas fermentações em estado sólido, de tolerância a baixas atividades de água e produção de enzimas através das hifas (RAIMBAULT, 1998). Entretanto, apesar das atividades lipolíticas na fermentação em estado sólido terem sido superiores às da fermentação submersa, em etapas anteriores de otimização da produção de lipases via fermentação em estado sólido utilizando o fungo O-4, obtiveram-se atividades ainda superiores (57 U).

A atividade emulsificante O/A máxima obtida pelo *Aspergillus* sp. O-8 (2,95 UE) em fermentação submersa foi inferior às relatadas por Martins et al. (2007), que obtiveram atividades emulsificantes O/A máximas durante a fermentação em estado sólido com bactéria (*Corynebacterium aquaticum*) e fungo (*Aspergillus fumigatus*) de 209,4 e 327,9 UE, respectivamente. Entretanto, comparando-se os resultados de índice de emulsificação O/A obtidos no presente trabalho ($ABS_{610\text{ nm}}$) com os relatados por Vasileva-Tonkova e Gesheva (2007), que estudaram a produção de biossurfactantes por *Pantoea* sp. durante o crescimento em hidrocarbonetos, os índices de emulsificação (550 nm) para o biossurfactante produzido em meio de cultivo com 2% de querosene variaram de 0,35 a 3,86 UE mL⁻¹ em pH 7,0, dependendo do hidrocarboneto utilizado para a realização do teste, sendo estes resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Os biossurfactantes produzidos no trabalho citado caracterizavam-se como raminolipídios, ou seja, biossurfactantes de baixo peso molecular e foram capazes de reduzir as tensões superficiais do meio de cultivo até 37mN m⁻¹. Thavasi et al. (2007) obtiveram índices de emulsificação O/A 0,41 a 1,72 (D_{610}) para o biossurfactante isolado de *Corynebacterium kutscheri* utilizando como fase oleosa principalmente hidrocarbonetos derivados do petróleo e óleo de amendoim, sendo o biossurfactante caracterizado como um glicopeptídeo.

Com relação à atividade emulsificante A/O, o biossurfactante produzido pelo fungo *Aspergillus* sp. O-8 via fermentação submersa apresentou índice de emulsificação 42,7 UE utilizando óleo de soja como fase lipídica. Martins et al. (2007) utilizando a mesma metodologia, obtiveram atividades 60,8 UE e 57,5 UE para os biossurfactantes produzidos por bactéria e fungo, respectivamente. Kumar et al. (2007) obtiveram índices de emulsificação A/O de 70% (UE) para o exopolissacarídeo produzido por *Planococcus maitriensis* Anita I. Abouseoud et al. (2008) obtiveram índices de emulsificação de 45 a 55% utilizando como fases oleosas diesel, querosene, heptano e óleo de girassol, para o raminolipídios produzido por *Pseudomonas fluorescens*.

4.7.5.2. Correlação com a produção de lipases com as atividades emulsificantes, tensão superficial e atividade antimicrobiana dos extratos da fermentação submersa

Em virtude da fermentação submersa ter apresentado os melhores resultados de atividades emulsificantes, foi avaliada a correlação com a produção de lipases, bem como a tensão superficial e a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos.

A Figura 1 apresenta a correlação entre a atividade emulsificante e a produção de lipases. A atividade emulsificante óleo em água apresentou correlação polinomial de segunda ordem com a atividade lipolítica (Figura 1a), apresentando um coeficiente de correlação 95,4%. A atividade emulsificante água em óleo apresentou correlação linear de 86,8% (Figura 1b), indicando a produção simultânea de lipases e biossurfactantes no meio de cultivo.

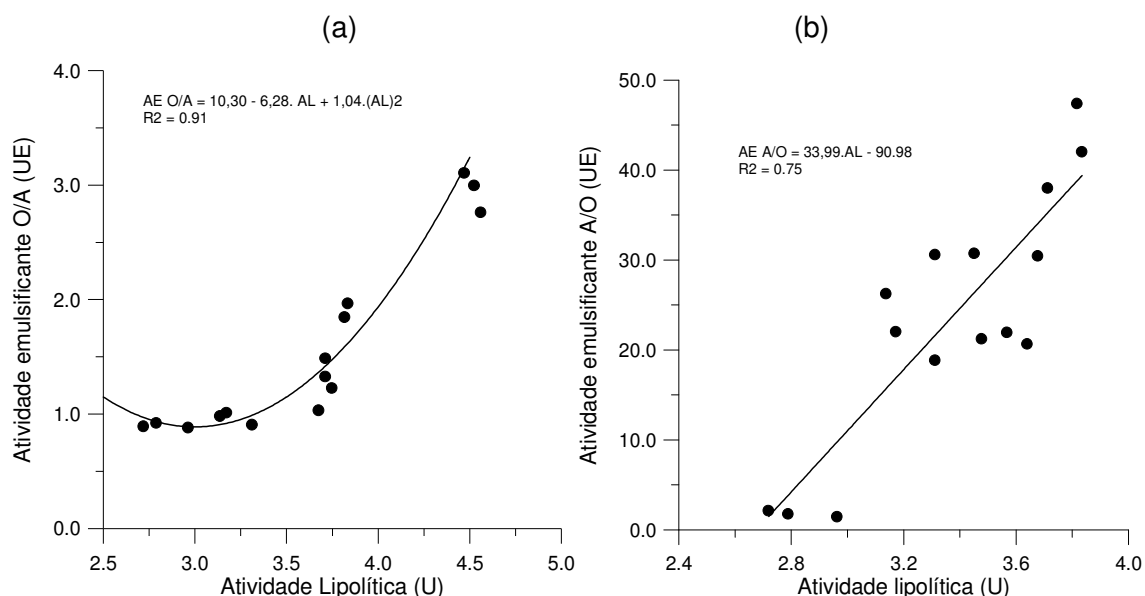


Figura 1 Correlação da produção de lipases e atividades emulsificantes óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O)

As porções polar e apolar constituintes das moléculas com propriedades surfactantes são sintetizadas a partir das vias de síntese de lipídios e carboidratos (DESAI E BANAT, 1997). As lipases podem estar envolvidas no processo de síntese de biossurfactantes porque realizando a hidrólise dos triacilgliceróis constituintes do indutor (óleo de soja), ocasionam a liberação de ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis, os quais são compostos que apresentam estruturas com porções polares e apolares em uma mesma molécula, portanto podendo apresentar atividades de redução da tensão superficial e emulsificantes.

O glicerol liberado pode ser utilizado para a síntese de açúcares (BERG et al., 2002), os quais podem ser esterificados aos ácidos graxos livres para a formação de ésteres de açúcares (glicolipídios de baixo peso molecular que explicariam a atividade superficial diminuída dos extratos), similarmente ao que ocorre em reações de síntese orgânica de biossurfactantes utilizando lipases.

Ainda, os ácidos graxos liberados podem ser utilizados pelo microrganismo como substrato para constituir a fração lipídica do biossurfactante, sendo os ácidos graxos metabolizados através da β -oxidação e reutilizados para a síntese dos bioemulsificantes, como relatado por Kitamoto et al. (2002). Segundo estes autores, quando álcoois ou ácidos graxos de cadeia longa (12 a 18 carbonos) são usados como substratos, os ácidos graxos presentes no biossurfactante (glicolipídio-manosterileritrol) possuem cadeias de 2,4 ou 6 carbonos. Ácidos graxos pares como substratos ou ímpares geram biossurfactantes com cadeias pares ou ímpares respectivamente, ou seja, os ácidos graxos presentes nos biossurfactantes são intermediários da degradação dos ácidos via β -oxidação dos substratos. A adição de um inibidor da síntese de ácidos graxos, afetou pouco a produção dos biossurfactantes, enquanto a adição de um inibidor da β -oxidação afetou inibiu a produção dos mesmos (KITAMOTO et al., 2002).

A Tabela 2 apresenta os resultados das tensões superficiais obtidas pelos extratos da fermentação submersa (*Aspergillus* sp. O-8) ao longo do tempo, verificando-se que a tensão superficial do meio fermentado foi reduzida pela produção do biossurfactante até o mínimo de 28,8 mN/m, sendo a tensão superficial do meio no tempo inicial de 50 mN m⁻¹. O aumento da tensão superficial nos extratos obtidos no tempo de 6 dias de fermentação podem ser devidos a degradação das moléculas de biossurfactantes.

Segundo Pyaza et al. (2006), a redução da tensão superficial é um bom indicativo da produção de biossurfactantes, porém não estando relacionada com a capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido. Os biossurfactantes com capacidade de redução da tensão superficial geralmente apresentam estruturas de baixo peso molecular, como glicolipídios ou lipopeptídios, enquanto que biossurfactantes de elevado peso molecular como polissacarídios anfipáticos, proteínas, lipopolissacarídios, lipoproteínas ou

misturas complexas desses biopolímeros, estão associados à capacidade de emulsificação (ROSENBERG e RON, 1999).

Tabela 2 Tensão superficial (mN m^{-1}) dos extratos obtidos durante a fermentação submersa com o fungo *Aspergillus* O-4

| Tempo de fermentação (d) | Tensão superficial (mN.m^{-1}) |
|--------------------------|---|
| 0 | $50,0 \pm 3,14$ |
| 1 | $31,2 \pm 0,08$ |
| 2 | $30,3 \pm 0,18$ |
| 3 | $30,8 \pm 0,15$ |
| 4 | $28,8 \pm 0,47$ |
| 5 | $29,3 \pm 0,73$ |
| 6 | $52,3 \pm 0,62$ |

As maiores atividades emulsificantes e a maior redução da tensão superficial nos extratos da fermentação submersa foram obtidas durante a fase estacionária de crescimento do microrganismo (Figura 1), o que está de acordo com o padrão de metabolismo da síntese de biossurfactantes (RON e ROSEMBERG, 2001). Quando inicia a limitação de nutrientes a velocidade de crescimento decresce, mas o carbono continua sendo transportado para o interior das células e utilizado para a biossíntese de lipídios, sendo que os produtos finais formados nestas circunstâncias podem ser lipídios, polissacarídios, polímeros de estocagem como o poli-hidroxibutirato ou antibióticos. Os nutrientes limitantes que podem levar a estas condições são o nitrogênio, magnésio, ferro e fósforo (KOSARIC e CAIRNS, 1987). Já na fermentação em estado sólido, os picos de atividade emulsificante foram obtidos durante a fase de crescimento do microrganismo, justificando as baixas produções obtidas.

A Figura 2a apresenta os resultados de absorvância (610 nm) durante o tempo de incubação (h) para os cultivos de *Staphylococcus aureus* na presença dos extratos estéreis produzidos por fermentação submersa pelo fungo *Aspergillus* sp. O-8, verificando-se que os extratos obtidos foram capazes de inibir o crescimento da bactéria. O potencial antimicrobiano dos extratos foi calculado para o tempo de 10 h de incubação dos cultivos de *S. aureus*, obtendo-se os resultados apresentados na Figura 2b.

Observou-se que os extratos que apresentaram maiores potenciais antimicrobianos frente ao *S. aureus* foram os obtidos nos tempos iniciais de fermentação submersa com o fungo *Aspergillus* sp. (Figura 2). Os extratos dos três primeiros dias de fermentação apresentaram potenciais antimicrobianos variando de 36 a 43%, sendo que nestes tempos foram obtidas elevadas atividades emulsificantes O/A (1,76 UE), A/O (42,7 UE) e redução da tensão superficial dos meios de 50 mN m^{-1} para $30,8 \text{ mN m}^{-1}$, associando a atividade antimicrobiana dos extratos com a produção dos biossurfactantes.

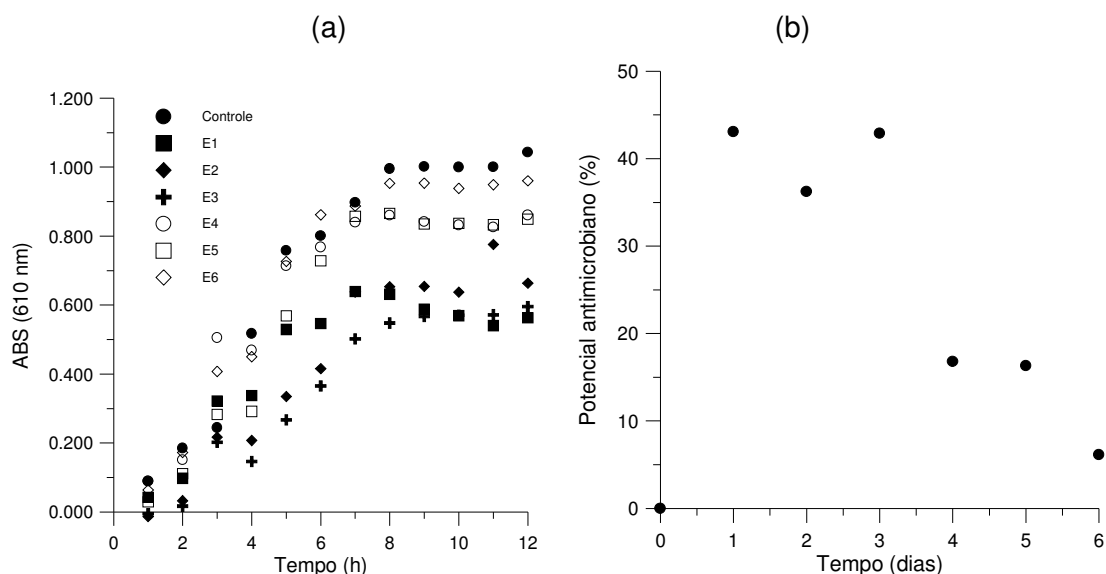


Figura 2 Absorbância versus tempo de incubação para os cultivos de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na presença dos extratos produzidos por fermentação submersa pelo fungo *Aspergillus* sp O-8 (a), e potencial antimicrobiano (%) dos extratos obtidos no tempo de 10 h de incubação do *S.aureus* (b)

A ação de solubilização dos surfactantes é responsável pela sua atividade antimicrobiana, principalmente em bactérias gram-positivas, mais do que em gram-negativas, devido a diferença na parede celular. Dentre os microrganismos relatados por serem inibidos por glicolipídios estão bactérias gram-positivas, gram-negativas, leveduras e fungos (KITAMOTO et al., 2002).

Outros autores relataram a atividade antimicrobiana de biossurfactantes. A atividade antimicrobiana de extratos da *P. fluorescens* foi determinada pela adição dos extratos em frente a células frescas de *B. subtilis* crescendo em placas de petri. A zona de hemólise foi de 11 mm. No teste de inibição houve o aparecimento de uma zona de inibição com diâmetro de 25 mm utilizando o sobrenadante concentrado de *P. fluorescens* (ABOUSEOUD et al., 2008).

Uma fração de um biossurfactante produzido por *Lactococcus lactis* 53, caracterizada como uma glicoproteína, apresentou atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus* e *Candida* (*S. epidermidis* GB 9/6, *S. salivarius* GB 24/9, *S. aureus* GB 2/1, *C. albicans* GBJ 13/4A e *C. tropicalis* GB 9/9) na maior concentração do biossurfactante testada (40 g.L⁻¹). Mesmo na menor concentração testada (2,5 g.L⁻¹), o biossurfactante foi capaz de inibir a *C tropicalis* (RODRIGUES et al., 2006c).

Nitschke e Costa (2007) revisaram a atividade antimicrobiana apresentada por biossurfactantes produzidos por bactérias, leveduras e fungos, sendo relatadas as atividades antimicrobianas de lipopeptídios (itaurina) frente a fungos, raminolipídios frente a

algas, bactérias (*E. coli*, *S. epidermidis*, *Alcaligenes faecalis*) e fungos (*A. niger*, *Penicillium crysogenum*), soforolipídios frente a fungos e manosterillipídios frente a bactérias gram positivas.

4.7.6. CONCLUSÃO

A produção de lipases apresenta vantagens se realizada via fermentação em estado sólido, devido as maiores atividades enzimáticas obtidas, entretanto, a produção simultânea de biossurfactantes neste modo de cultivo não foi observada, devido a aparente perda da capacidade do fungo de produção destes biocompostos. A atividade emulsificante óleo em água apresentou correlação polinomial de segunda ordem com a atividade lipolítica, com coeficiente de correlação de 95,4%, enquanto que a atividade emulsificante água em óleo apresentou correlação linear de 86,8%, indicando a produção simultânea de lipases e biossurfactantes no meio de cultivo. A atividade lipolítica máxima obtida na fermentação submersa foi 4,52 U e atividades emulsificantes máximas O/A e A/O, 2,95 e 42 UE, respectivamente. A redução da tensão superficial nos meios foi de 50 para 28 mN m⁻¹ e os potenciais antimicrobianos frente ao *S. aureus* ATCC 25923 foram de 36 a 43%, indicando a produção do biossurfactante pelo fungo *Aspergillus* sp. O-8.

Agradecimentos: ao CNPq pelo apoio financeiro.

4.7.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abouseoud, M.; Maachi, R.; Amrane, A.; Boudergua, S. Nabi, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, v. 223, p. 143-151, 2008.

AOAC. Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, USA. ISBN 0-935584-54-4, 1995.

Berg. J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. **Bioquímica**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002.

Bertolin et al., T.E.; Costa, J.A.V.; Pasquali, G.D.L. Glucoamylase production in batch and fed-batch solid state fermentation: effect of maltose or starch addition. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 13-16, 2001.

Burkert, J.F.M.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technology*, v. 91, p. 77-84, 2004.

Costa, S.G.V.A.O.; Nitschke, A.; Haddad, R.; Eberlin, M.N.; Contiero, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483-488, 2006.

Couto, S.R., Sanromán, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. **Journal of Food Engineering**, v.76, n.3, p. 291-302, 2006.

Desai, J.D. e Banat, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p. 47-64, 1997.

Dupuis, C.; Corre, C.; Boyaval, P. Lipase and Esterase Activities of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*. **Applied and environmental microbiology**, v.59, n.12, p. 4004-4009, 1993.

Hasan, F.; Shah, A.A.; Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

Joshi, S.; Bharucha, C.; Jha, S.; Yadav, S.; Nerurkar, A.; Desai, A.J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 195-199, 2008.

Kim, H.J.; Youn, S.H.; Shin, C.S. Lipase-catalyzed synthesis of sorbitol–fatty acid esters at extremely high substrate concentrations. **Journal of Biotechnology**, v.123, n. 2, p. 174-184, 2006.

Kitamoto, D.; Isoda, H.; Nakahara, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants – from energy-saving materials to gene delivery carriers - . **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 3, p. 187-201, 2002.

Kittikun, A.H.; Kaewthong, W.; Cheirsilp, B. Continuous production of monoacylglycerols from palm olein in packed-bed reactor with immobilized lipase PS. **Biochemical Engineering Journal**, v.40, p. 116-120, 2008.

Kosaric, N.; Cairns, W. L. Biosurfactants and Biotechnology. Marcel Dekker, Inc., New York, v. 1, p. 21-46 e 47-88, 1987.

Kumar, A.S.; Mody, K.; Jha, B. Evaluation of biosurfactant/bioemulsifier production by a marine bacterium. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 79, p. 617-621, 2007.

Leal, M.C.M.R.; Cammarota, M.C.C., Freire, D.M.G.; Sant'Anna Jr., G.L. Hidrolytic enzymes as adjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 175-180, 2002.

Lonsane, B.K.; Ghildyal, N.P.; Budaitman, S.; Ramakrishna, S.V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 7, p. 258-265, 1985.

Martins, R. G.; Silva M. A.; Pinto, M. H.; Costa J.A.V. Biosurfactantes bacteriano e fúngico: Produção através de fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais. In **XXII Congresso Regional de Iniciação Científica e Tecnológica em Engenharia**, 2007.

Martins, V.G.; Kalil, S.J.; Bertolin, T.E.; Costa, J.A.V. Solid state biosurfactant production in a fixed-bed column bioreactor. **Z. Naturforsch.**, v. 61c, p. 721-726, 2006.

Mulligan, C. N.; Yong, R. N.; Gibbs, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, p. 371-380, 2001.

Nitschke, M.; Costa, S.G.V.A.O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, p. 252 a 259; 2007.

Nitschke, M.; Pastore, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

Nitschke, M.; Pastore, G.M. Biosurfactantes a partir de resíduos agroindustriais. **Biociência e Desenvolvimento**, p. 63-67, 2003.

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

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

Park, E.Y.; Sato, M.; Kojima, S. Fatty acid methyl ester production using lipase-immobilizing silica particles with different particle sizes and different specific surface areas. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 889–896, 2006.

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

Pyaza, G.A.; Zjawiony, I.; Banat, I.M. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. **J Petrol Sci Eng**, v. 50, p. 71-77, 2006.

Raimbault, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 174-188, 1998.

Reshma, M.V.; Saritha, S.S.; Balachandran, C.; Arumughan, C. Lipase catalyzed interesterification of palm stearin and rice bran oil blends for preparation of zero trans shortening with bioactive phytochemicals. **Bioresour Technol.**, v. 99, n. 11, p.5011-5019, 2008.

Rodrigues, L.R.; Teixeira, J.A.; Oliveira, R. Low-cost fermentative médium for biosurfactant production by probiotic bactéria. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 135-142, 2006a.

Rodrigues, L.; Moldes, A.; Teixeira, J.; Oliveira, R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 109-116, 2006b.

Rodrigues, L.R.; Teixeira, J.A. Van der Mei, H.C. Oliveira, R. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 49, p. 79-86, 2006c.

Ron, E. Z.; Rosemberg, E. Natural roles of biosurfactantes. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 229-236, 2001.

Rosenberg, E.; Rón, E.Z. High and low molecular mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 52, p. 154-162, 1999.

Saisubramanian, N.; Edwinoliver, N.G.; Nandakumar, N.; Kamini, N.R.; Puvanakrishnan, R. Efficacy of lipase from *Aspergillus niger* as an additive in detergent formulations: a statistical approach. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 33, p. 669-676, 2006.

Salah, R.B.; Ghamghui, H.; Miled, N.; Mejdoub, H.; Gargouri, Y. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 368–372. 2007

Schmidell, W.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Lima, U. A. **Biotecnologia Industrial**. V. 2. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001.

Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, Y. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

Tarahomjoo, S.; Alemzadeh, I. Surfactant production by an enzymatic method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 33–37, 2003

Thavasi, R.; Jayalakshmi, S.; Balasubramanian, T.; Banat, I.M. Biosurfactant production by *Corynebacterium kutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 686-6914, 2007.

Valiseva-Tonkova, E.; Gesheva, V. Biosurfactant production by Antarctic facultative anaerobe *Pantoea* sp. during growth on hydrocarbons. **Current Microbiology**, v. 54, p. 136-141, 2007.

Van Dyke, M.I.; Lee, H e Trevors, J.T. Applications of microbial surfactants. **Biotechnology Advances**, v. 9, p. 241-252, 1991.

Van Hamme, J.D.; Singh, A.; Ward, O.P. Physiological aspects - Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 604–620, 2006.

Wang, Y.; Li, X.; Liang, Y.; Yang, B.; Zhang, S. Enzymatic fractionation of conjugated linoleic acid isomers by selective esterification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 46, p. 20–25, 2007.

Yu, J.; Zhang, J.; Zhao, A.; Ma, X. Study of Glucose Ester synthesis by immobilized lipase from *Candida sp.* **Catalysis Communications**, v.9, n. 31, p. 1369-1374, 2008.

CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO GERAL

5. CONCLUSÃO GERAL

O isolamento de 28 fungos, 8 a partir de um solo contaminado com óleo diesel e 20 a partir de efluente da indústria de laticínios foi realizado. Os fungos *Aspergillus* O-4 e E-6 foram selecionados como bons produtores de lipases via fermentação em estado sólido, com atividades lipolíticas de 45,5 U e 49,81 U. Os fungos *Penicillium* E-3, *Trichoderma* E-19 e *Aspergillus* O-8 foram selecionados como bons produtores de lipases via fermentação submersa, com atividades lipolíticas de 2,81, 2,34 e 2,03 U, respectivamente.

As condições otimizadas para a produção de lipases via fermentação em estado sólido foram obtidas utilizando-se o fungo *Aspergillus* O-4, farelo de soja como principal componente do meio de cultivo, 2% de nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, 2% de azeite de oliva como indutor e pH's variando de 3,5 a 4,5, obtendo-se atividades lipolíticas máximas de 57 U. As lipases obtidas apresentaram ótimos de temperatura e pH em torno de 35°C e pH 6,0 e atividades residuais de 63,6 e 26,8% após 1h de exposição a 50 e 60°C, respectivamente. A estabilidade ao pH foi superior em pH's alcalinos, com atividades residuais superiores a 60%.

As condições otimizadas para a produção de lipases via fermentação submersa foram obtidas utilizando-se o fungo *Aspergillus* O-8, farelo de trigo como principal componente do meio de cultivo, 4,5% de extrato de levedura como fonte de nitrogênio, 2% de óleo de soja como indutor e pH 7,15. As máximas atividades obtidas durante a etapa de otimização foram de em torno de 6 U. As lipases apresentaram atividades máximas a 37°C e pH 7,2, com atividades residuais de 72% após 1 h de exposição entre 70 e 90°C e 80 e 50% de atividades residuais em pH's nas faixas de 3,5 a 6,5 e 7 a 10.

Na fermentação em estado sólido obtiveram-se atividades lipolíticas superiores às obtidas na fermentação submersa, da ordem de 57 e 6 U, respectivamente.

A otimização estatística da fermentação em estado sólido tornou possível um aumento nas atividades lipolíticas de 45,5 a 57 U, comparando-se as atividades obtidas desde a etapa de isolamento dos fungos até a etapa de otimização, sendo este um aumento de 25%. Na otimização da fermentação submersa, as atividades aumentaram de 2 para 6 U, com aumento de 200 %.

A produção de lipases foi concomitante ao aumento da atividade emulsificante dos meios na fermentação submersa, sendo obtida máxima atividade lipolítica de 4,52 U e máximas atividades emulsificantes O/A e A/O de 2,95 EU e 42,7 EU, respectivamente, com correlações de 90,1% e 86,8% com a produção de lipases. A redução da tensão superficial nos meios foi de 50 para 28 mN m⁻¹ sendo este mais um indicativo da produção de biossurfactantes. Os extratos também apresentaram potenciais antimicrobianos frente ao *S. aureus* ATCC 25923, inibindo de 36 a 43% o crescimento deste microrganismo. Na

fermentação em estado sólido, embora a maior produtividade em lipases tenha sido observada, não houve produção concomitante de biossurfactantes.

A fermentação submersa foi a que apresentou os melhores resultados de otimização da produção de lipases, bem como de produção simultânea de biossurfactantes. As lipases e os bioemulsificantes obtidos podem ser aplicados na indústria alimentícia, farmacêutica ou na biorremediação.

As sugestões para a realização de trabalhos futuros são: caracterizar os biossurfactantes produzidos quanto a sua estrutura; avaliar a aplicabilidade dos biossurfactantes como emulsificantes e compostos antimicrobianos, bem como na facilitação do processo de biorremediação de compostos; avaliar a produção de bioemulsificantes através de outras cepas isoladas neste trabalho; aplicar as lipases obtidas na produção de biodiesel; realizar o estudo do aumento de escala da produção de lipases e biossurfactantes.

APÊNDICES

APÊNDICE A

ARTIGO 3: PRODUÇÃO DE LIPASES DE *ASPERGILLUS* SPP VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO TÉCNICAS ESTATÍSTICAS

PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2^{7-3}

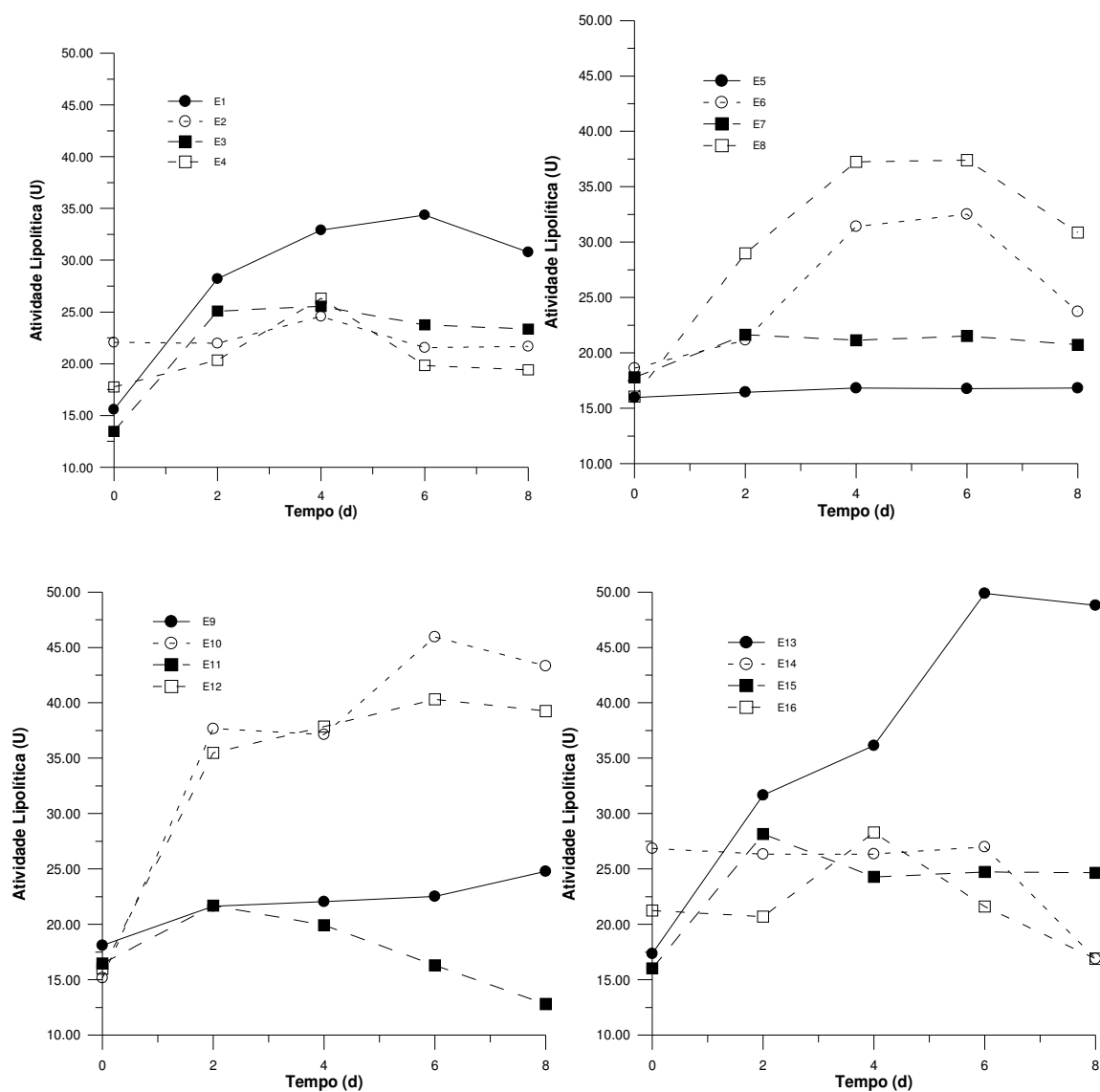


Figura 1 Atividade lipolítica em função do tempo para os experimentos do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} utilizado para a seleção de variáveis significativas no processo de produção de lipases via fermentação em estado sólido

Tabela 1 Análise de variância dos resultados de atividade lipolítica obtidos no Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} utilizado para a seleção de variáveis significativas no processo de produção de lipases via fermentação em estado sólido

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado Médio | F | p |
|-------------------------|--------------------|--------------------|----------------|--------|---------|
| X ₁ - F | 341,61 | 1 | 341,61 | 17,23 | < 0,001 |
| X ₂ - FN | 452,52 | 1 | 452,52 | 22,83 | < 0,001 |
| X ₃ - CFN | 14,71 | 1 | 14,71 | 0,74 | 0,3926 |
| X ₄ - I | 424,12 | 1 | 424,12 | 21,39 | < 0,001 |
| X ₅ - CI | 39,15 | 1 | 39,15 | 1,97 | 0,165 |
| X ₆ - pH | 372,37 | 1 | 372,37 | 18,78 | < 0,001 |
| X ₇ - Fungo | 3590,71 | 1 | 3590,71 | 181,12 | < 0,001 |
| Erro | 1110,21 | 56 | 19,82 | | |
| Soma de quadrados total | 6304,77 | 63 | | | |

F: farelo; FN: fonte de nitrogênio CFN: conc. da fonte de nitrogênio; I: indutor; CI: conc. do indutor

Tabela 2 Efeitos estimados das variáveis do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3}

| Fonte de variação | Efeito estimado | Erro padrão | t (56) | p |
|------------------------|-----------------|-------------|--------|---------|
| Média | 28,56 | 0,56 | 50,86 | < 0,001 |
| X ₁ - F | 4,66 | 1,12 | 4,15 | < 0,001 |
| X ₂ - FN | -5,36 | 1,12 | -4,78 | < 0,001 |
| X ₃ - CFN | 0,97 | 1,12 | 0,86 | 0,3926 |
| X ₄ - I | 5,19 | 1,12 | 4,62 | < 0,001 |
| X ₅ - CI | 1,58 | 1,12 | 1,40 | 0,165 |
| X ₆ - pH | -5,11 | 1,18 | -4,33 | < 0,001 |
| X ₇ - Fungo | -15,11 | 1,12 | -13,46 | < 0,001 |

F: farelo; FN: fonte de nitrogênio CFN: conc. da fonte de nitrogênio; I: indutor; CI: conc. do indutor

PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2⁴

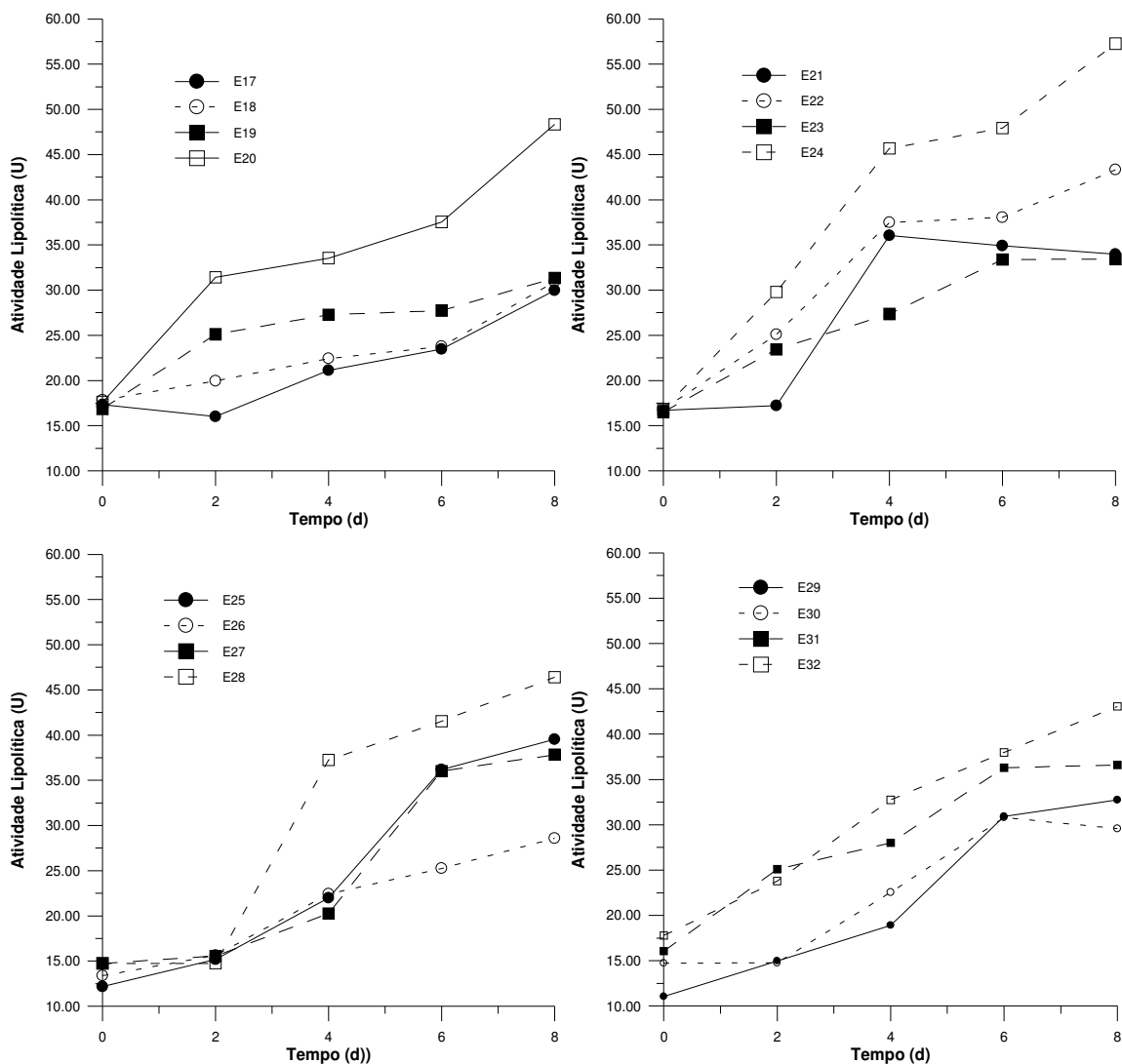


Figura 2 Atividade lipolítica em função do tempo para os experimentos do Planejamento Fatorial Completo 2⁴

Tabela 3 Análise de variância dos resultados de atividade lipolítica obtidos no Planejamento Fatorial Completo 2⁴

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado Médio | F | p |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|----------------|--------|---------|
| Tipo de farelo (X ₁) | 678,66 | 1 | 678,66 | 207,82 | < 0,001 |
| Fonte de N (X ₂) | 1078,15 | 1 | 1078,15 | 330,16 | < 0,001 |
| Fonte de C (X ₃) | 72,22 | 1 | 72,22 | 22,12 | < 0,001 |
| pH (X ₄) | 51,00 | 1 | 51,00 | 15,62 | < 0,001 |
| X ₁ .X ₂ | 891,74 | 1 | 891,74 | 273,08 | < 0,001 |
| X ₁ .X ₃ | 108,61 | 1 | 108,61 | 33,26 | < 0,001 |
| X ₁ .X ₄ | 631,37 | 1 | 631,37 | 193,34 | < 0,001 |
| X ₂ .X ₃ | 4,29 | 1 | 4,29 | 1,31 | 0,257 |
| X ₂ .X ₄ | 0,39 | 1 | 0,39 | 0,12 | 0,732 |
| X ₃ .X ₄ | 356,80 | 1 | 356,80 | 109,26 | < 0,001 |
| Erro | 173,07 | 53 | 3,27 | | |
| Soma dos Quadrados Totais | 4046,31 | 63 | | | |

Tabela 4 Efeitos estimados das variáveis do Planejamento Fatorial Fracionário 2⁴

| Fonte de variação | Efeito estimado | Erro padrão | t (53) | p |
|----------------------------------|-----------------|-------------|--------|---------|
| Média | 37,68 | 0,23 | 166,82 | < 0,001 |
| Tipo de farelo (X ₁) | 6,51 | 0,45 | 14,42 | < 0,001 |
| Fonte de N (X ₂) | 8,21 | 0,45 | 18,17 | < 0,001 |
| Fonte de C (X ₃) | 2,12 | 0,45 | 4,70 | < 0,001 |
| pH (X ₄) | -1,79 | 0,45 | -3,95 | < 0,001 |
| X ₁ .X ₂ | 7,47 | 0,45 | 16,53 | < 0,001 |
| X ₁ .X ₃ | 2,61 | 0,45 | 5,77 | < 0,001 |
| X ₁ .X ₄ | -6,28 | 0,45 | -13,90 | < 0,001 |
| X ₂ .X ₃ | -0,52 | 0,45 | -1,15 | 0,257 |
| X ₂ .X ₄ | 0,16 | 0,45 | 0,34 | 0,732 |
| X ₃ .X ₄ | -4,72 | 0,45 | -10,45 | < 0,001 |

Tabela 5 Coeficientes de regressão do Planejamento Fatorial Fracionário 2⁴

| Fonte de variação | Coeficiente de Regressão | Erro padrão | t (53) | p |
|----------------------------------|--------------------------|-------------|--------|---------|
| Média | 37,68 | 0,23 | 166,82 | < 0,001 |
| Tipo de farelo (X ₁) | 3,26 | 0,23 | 14,42 | < 0,001 |
| Fonte de N (X ₂) | 4,10 | 0,23 | 18,17 | < 0,001 |
| Fonte de C (X ₃) | 1,06 | 0,23 | 4,70 | < 0,001 |
| pH (X ₄) | -0,89 | 0,23 | -3,95 | < 0,001 |
| X ₁ .X ₂ | 3,73 | 0,23 | 16,53 | < 0,001 |
| X ₁ .X ₃ | 1,30 | 0,23 | 5,77 | < 0,001 |
| X ₁ .X ₄ | -3,14 | 0,23 | -13,90 | < 0,001 |
| X ₂ .X ₃ | -0,26 | 0,23 | -1,15 | 0,257 |
| X ₂ .X ₄ | 0,08 | 0,23 | 0,34 | 0,732 |
| X ₃ .X ₄ | -2,36 | 0,23 | -10,45 | < 0,001 |

APÊNDICE B
ARTIGO 4: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR
FERMENTAÇÃO SUBMERSA

PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN (9 VARIÁVEIS E 16 EXPERIMENTOS)

Tabela 1 Análise de variância dos resultados de atividade lipolítica do Planejamento Plackett Burman

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado Médio | F | p |
|-------------------------------------|--------------------|--------------------|----------------|-------|--------|
| Farelo | 1,23 | 1 | 1,23 | 2,47 | 0,130 |
| Fonte de nitrogênio | 10,66 | 1 | 10,66 | 21,51 | <0,001 |
| Indutor | 0,24 | 1 | 0,24 | 0,49 | 0,490 |
| Concentração da fonte de nitrogênio | 2,11 | 1 | 2,11 | 4,25 | 0,051 |
| Concentração do indutor | 1,85 | 1 | 1,85 | 3,74 | 0,066 |
| pH | 7,47 | 1 | 7,47 | 15,09 | 0,001 |
| Fungo | 3,72 | 1 | 3,72 | 7,51 | 0,012 |
| Concentração inicial de inóculo | 0,71 | 1 | 0,71 | 1,43 | 0,245 |
| Agitação | 0,30 | 1 | 0,30 | 0,60 | 0,447 |
| Erro | 10,90 | 22 | 0,50 | | |
| Soma de Quadrados Totais | 39,18 | 31 | | | |

Tabela 2 Efeitos estimados das variáveis do Planejamento Plackett Burman

| Fonte de variação | Efeito estimado | Erro padrão | t (22) | p |
|-------------------------------------|-----------------|-------------|--------|--------|
| Média | 1,60 | 0,12 | 12,87 | <0,001 |
| Farelo | -0,39 | 0,25 | -1,57 | 0,130 |
| Fonte de nitrogênio | 1,15 | 0,25 | 4,64 | <0,001 |
| Indutor | -0,17 | 0,25 | -0,70 | 0,490 |
| Concentração da fonte de nitrogênio | 0,51 | 0,25 | 2,06 | 0,051 |
| Concentração do indutor | -0,48 | 0,25 | -1,93 | 0,066 |
| pH | 0,97 | 0,25 | 3,88 | 0,001 |
| Fungo | -0,68 | 0,25 | -2,74 | 0,012 |
| Concentração inicial de inóculo | 0,30 | 0,25 | 1,20 | 0,245 |
| Agitação | 0,19 | 0,25 | 0,77 | 0,447 |

PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2³

Tabela 3 Análise de variância dos resultados de atividade lipolítica do Planejamento Fatorial Completo 2³

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado Médio | F | p |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|----------------|-------|-------|
| CEL (X ₁) | 2,04 | 1 | 2,04 | 24,80 | 0,001 |
| COS (X ₂) | 0,37 | 1 | 0,37 | 4,47 | 0,064 |
| pH (X ₃) | 1,64 | 1 | 1,64 | 19,97 | 0,002 |
| X ₁ .X ₂ | 0,15 | 1 | 0,15 | 1,77 | 0,216 |
| X ₁ .X ₃ | 0,03 | 1 | 0,03 | 0,40 | 0,541 |
| X ₂ .X ₃ | 0,19 | 1 | 0,19 | 2,30 | 0,164 |
| Erro | 0,74 | 9 | 0,08 | | |
| Soma dos Quadrados Totais | 5,15 | 15 | | | |

CEL: concentração de extrato de levedura (g/L); COS: concentração de óleo de soja (g/L)

Tabela 4 Efeitos estimados das variáveis do Planejamento Fatorial Completo 2³

| Fonte de variação | Efeito estimado | Erro padrão | t (22) | p |
|--------------------------------|-----------------|-------------|--------|-------|
| Média | 0,84 | 0,07 | 11,71 | 0,000 |
| CEL (X ₁) | 0,71 | 0,14 | 4,98 | 0,001 |
| COS (X ₂) | -0,30 | 0,14 | -2,11 | 0,064 |
| pH (X ₃) | 0,64 | 0,14 | 4,47 | 0,002 |
| X ₁ .X ₂ | -0,19 | 0,14 | -1,33 | 0,216 |
| X ₁ .X ₃ | -0,09 | 0,14 | -0,64 | 0,541 |
| X ₂ .X ₃ | -0,22 | 0,14 | -1,52 | 0,164 |

CEL: concentração de extrato de levedura (g/L); COS: concentração de óleo de soja (g/L)

Tabela 5 Coeficientes de Regressão do Planejamento Fatorial Completo 2³

| Fonte de variação | Coefficiente de Regressão | Erro padrão | t (9) | p |
|--------------------------------|---------------------------|-------------|-------|-------|
| Média | 0,84 | 0,07 | 11,71 | 0,000 |
| CEL (X ₁) | 0,36 | 0,07 | 4,98 | 0,001 |
| COS (X ₂) | -0,15 | 0,07 | -2,11 | 0,064 |
| pH (X ₃) | 0,32 | 0,07 | 4,47 | 0,002 |
| X ₁ .X ₂ | -0,10 | 0,07 | -1,33 | 0,216 |
| X ₁ .X ₃ | -0,05 | 0,07 | -0,64 | 0,541 |
| X ₂ .X ₃ | -0,11 | 0,07 | -1,52 | 0,164 |

CEL: concentração de extrato de levedura (g/L); COS: concentração de óleo de soja (g/L)

DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL

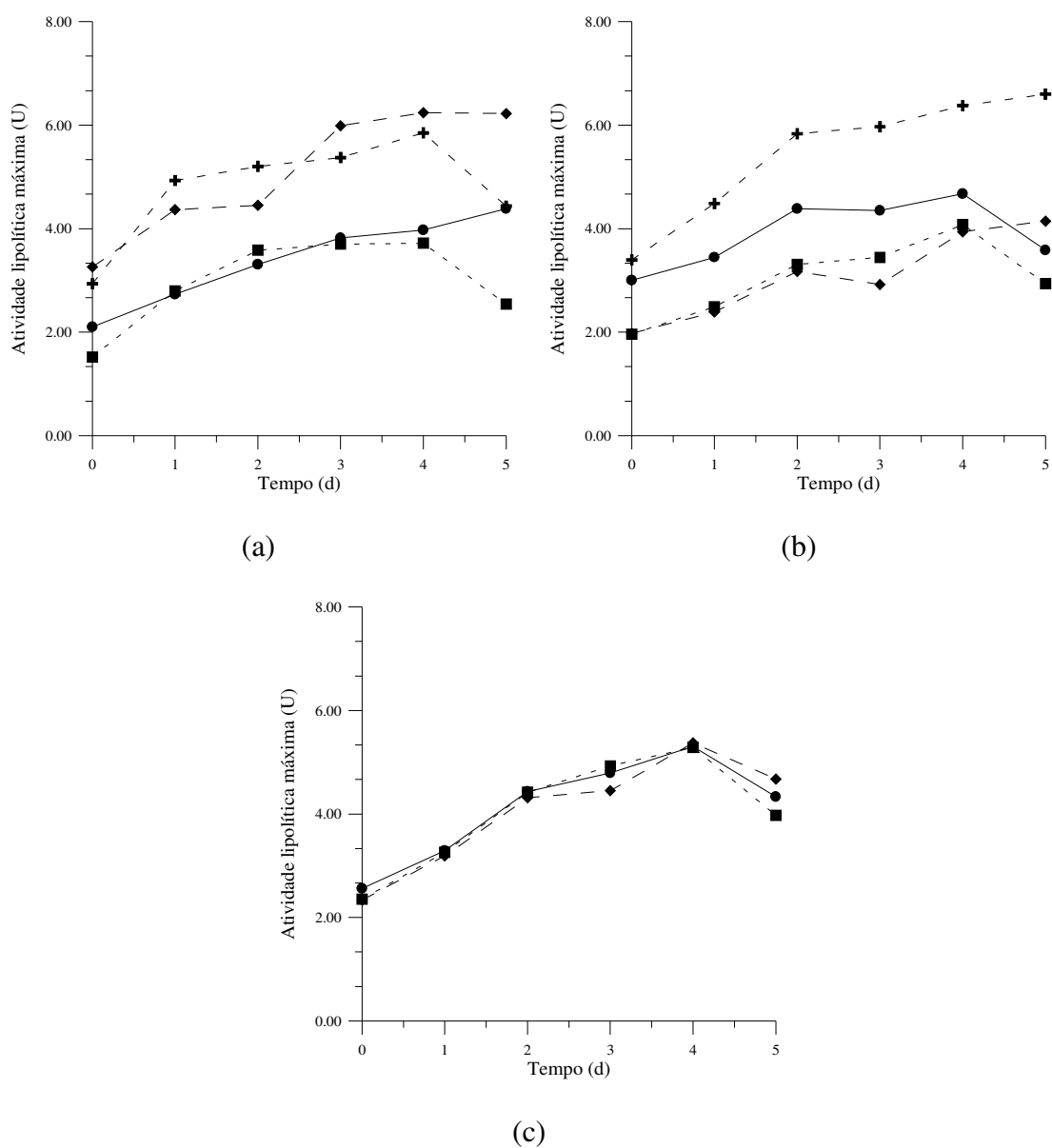


Figura 2 Atividades Lipolíticas em função do tempo de fermentação submersa para os experimentos do Delineamento Composto Central Rotacional utilizado para avaliação do efeito das variáveis pH e concentração de extrato de levedura.

(a) ● Exp. 25; ■ Exp. 26; ◆ Exp. 27; + Exp.28. (b) ● Exp. 29; ■ Exp. 30; ◆ Exp. 31; + Exp.32. (c) ● Exp. 33; ■ Exp. 34; ◆ Exp. 35.

Tabela 6 Análise de variância dos resultados de atividade lipolítica do Delineamento Composto Central Rotacional

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado Médio | F | p |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|----------------|-------|-------|
| X ₁ (L) | 0,20 | 1 | 0,20 | 5,78 | 0,029 |
| X ₁ (Q) | 2,12 | 1 | 2,12 | 60,45 | 0,000 |
| X ₂ (L) | 2,81 | 1 | 2,81 | 80,05 | 0,000 |
| X ₂ (Q) | 0,22 | 1 | 0,22 | 6,24 | 0,024 |
| X ₁ . X ₂ | 0,10 | 1 | 0,10 | 2,80 | 0,114 |
| Erro | 0,56 | 16 | 0,04 | | |
| Soma dos Quadrados Totais | 5,80 | 21 | | | |

X₁: pH; X₂: concentração de extrato de levedura; L: efeito linear; Q: efeito quadrático

Tabela 7 Efeitos estimados das variáveis do Delineamento Composto Central Rotacional

| Fonte de variação | Efeito estimado | Erro padrão | t (16) | p |
|---------------------------------|-----------------|-------------|--------|-------|
| Média | 2,92 | 0,08 | 38,20 | 0,000 |
| X ₁ (L) | 0,23 | 0,09 | 2,40 | 0,029 |
| X ₁ (Q) | -0,87 | 0,11 | -7,77 | 0,000 |
| X ₂ (L) | 0,84 | 0,09 | 8,95 | 0,000 |
| X ₂ (Q) | -0,28 | 0,11 | -2,50 | 0,024 |
| X ₁ . X ₂ | -0,22 | 0,13 | -1,67 | 0,114 |

X₁: pH; X₂: concentração de extrato de levedura; L: efeito linear; Q: efeito quadrático

Tabela 8 Coeficientes de regressão Delineamento Composto Central Rotacional

| Fonte de variação | Coefficiente de Regressão | Erro padrão | t (9) | p |
|---------------------------------|---------------------------|-------------|-------|-------|
| Média | 2,92 | 0,08 | 38,20 | 0,000 |
| X ₁ (L) | 0,11 | 0,05 | 2,40 | 0,029 |
| X ₁ (Q) | -0,43 | 0,06 | -7,77 | 0,000 |
| X ₂ (L) | 0,42 | 0,05 | 8,95 | 0,000 |
| X ₂ (Q) | -0,14 | 0,06 | -2,50 | 0,024 |
| X ₁ . X ₂ | -0,11 | 0,07 | -1,67 | 0,114 |

X₁: pH; X₂: concentração de extrato de levedura; L: efeito linear; Q: efeito quadrático

APÊNDICE C

ARTIGO 5: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LIPASE PRODUZIDA POR *ASPERGILLUS SP O-4* VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 3² PARA DETERMINAÇÃO DO PH E TEMPERATURA ÓTIMOS DA LIPASE PRODUZIDA VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Tabela 1 Análise de variância dos resultados de atividade lipolítica do Planejamento Fatorial Completo 3²

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado Médio | F | p |
|---------------------------|--------------------|--------------------|----------------|------|-------|
| X1 (L) | 130,8 | 1 | 130,8 | 6,2 | 0,021 |
| X1 (Q) | 1877,8 | 1 | 1877,8 | 89,4 | 0,000 |
| X2 (L) | 0,6 | 1 | 0,6 | 0,0 | 0,871 |
| X2 (Q) | 1325,3 | 1 | 1325,3 | 63,1 | 0,000 |
| X1. X2 | 51,7 | 1 | 51,7 | 2,5 | 0,132 |
| Erro | 441,0 | 21 | 21,0 | | |
| Soma dos Quadrados Totais | 3827,2 | 26 | | | |

X₁: pH; X₂: temperatura; L: efeito linear; Q: efeito quadrático

Tabela 2 Efeitos estimados das variáveis do Planejamento Fatorial Completo 3²

| Fonte de variação | Efeito estimado | Erro padrão | t (21) | p |
|---------------------------------|-----------------|-------------|--------|-------|
| Média | 49,25 | 1,97 | 24,97 | 0,000 |
| X ₁ (L) | 5,39 | 2,16 | 2,50 | 0,021 |
| X ₁ (Q) | -35,38 | 3,74 | -9,46 | 0,000 |
| X ₂ (L) | -0,35 | 2,16 | -0,16 | 0,871 |
| X ₂ (Q) | -29,72 | 3,74 | -7,94 | 0,000 |
| X ₁ . X ₂ | 4,15 | 2,65 | 1,57 | 0,132 |

X₁: pH; X₂: temperatura; L: efeito linear; Q: efeito quadrático

Tabela 3 Coeficientes de regressão obtidos a partir do Planejamento Fatorial Completo 3²

| Fonte de variação | Coefficiente de Regressão | Erro padrão | t (21) | p |
|---------------------------------|---------------------------|-------------|--------|-------|
| Média | 49,25 | 1,97 | 24,97 | 0,000 |
| X ₁ (L) | 2,70 | 1,08 | 2,50 | 0,021 |
| X ₁ (Q) | -17,69 | 1,87 | -9,46 | 0,000 |
| X ₂ (L) | -0,18 | 1,08 | -0,16 | 0,871 |
| X ₂ (Q) | -14,86 | 1,87 | -7,94 | 0,000 |
| X ₁ . X ₂ | 2,08 | 1,32 | 1,57 | 0,132 |

X₁: pH; X₂: temperatura; L: efeito linear; Q: efeito quadrático

Tabela 4 Atividade lipolítica residual após tratamento térmico dos extratos enzimáticos em temperaturas de 35 a 90°C

| Tempo (min) | Atividade Lipolítica Residual (%) | | | | | | |
|-------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 35 °C | 40 °C | 50 °C | 60 °C | 70 °C | 80 °C | 90 °C |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 5 | - | - | - | - | - | 78 | 65,1 |
| 10 | - | - | - | - | 87,5 | 64 | 53,5 |
| 15 | - | - | - | 61 | - | 42 | 37,2 |
| 20 | - | - | 90,9 | - | 83,3 | 22 | 27,9 |
| 25 | - | - | - | - | - | 16 | 14 |
| 30 | 91,5 | 88,6 | - | 46,3 | 58,3 | 8 | 9,3 |
| 35 | - | - | - | - | - | 4 | - |
| 40 | - | - | 77,3 | - | 47,9 | - | - |
| 45 | - | - | - | 36,6 | - | - | - |
| 50 | - | - | - | - | 43,8 | - | - |
| 60 | 85,1 | 90,9 | 63,6 | 26,8 | 27,1 | - | - |
| 70 | - | - | - | - | 20,8 | - | - |
| 75 | - | - | - | 14,6 | - | - | - |
| 80 | - | - | 50 | - | 16,7 | - | - |
| 90 | 80,9 | 72,7 | - | 7,3 | 6,3 | - | - |
| 100 | - | - | 36,4 | - | - | - | - |
| 120 | 76,6 | 70,5 | 22,7 | - | - | - | - |
| 140 | - | - | 15,9 | - | - | - | - |
| 150 | 74,5 | 68,2 | - | - | - | - | - |
| 180 | 68,1 | 59,1 | - | - | - | - | - |
| 210 | 66 | 56,8 | - | - | - | - | - |
| 240 | 55,3 | 54,5 | - | - | - | - | - |
| 270 | 44,7 | 50 | - | - | - | - | - |
| 300 | 38,3 | 47,7 | - | - | - | - | - |

APÊNDICE D

ARTIGO 6: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LIPASE PRODUZIDA POR *ASPERGILLUS* SP O-8 VIA FERMENTAÇÃO SUBMERSA

DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL PARA DETERMINAÇÃO DO PH E TEMPERATURA ÓTIMOS DA LIPASE PRODUZIDA VIA FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Tabela 1 Análise de variância dos resultados de atividade lipolítica do Delineamento
Composto Central Rotacional

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado Médio | F | p |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|----------------|-------|-------|
| X ₁ (L) | 1,26 | 1 | 1,26 | 16,49 | 0,001 |
| X ₁ (Q) | 0,73 | 1 | 0,73 | 9,56 | 0,007 |
| X ₂ (L) | 0,32 | 1 | 0,32 | 4,22 | 0,057 |
| X ₂ (Q) | 0,33 | 1 | 0,33 | 4,31 | 0,054 |
| X ₁ . X ₂ | 0,03 | 1 | 0,03 | 0,40 | 0,537 |
| Erro | 1,22 | 16 | 0,08 | | |
| Soma dos Quadrados Totais | 3,67 | 21 | | | |

X₁: pH; X₂: temperatura; L: efeito linear; Q: efeito quadrático

Tabela 2 Efeitos estimados das variáveis do Delineamento Composto Central Rotacional

| Fonte de variação | Efeito estimado | Erro padrão | t (16) | p |
|---------------------------------|-----------------|-------------|--------|-------|
| Média | 4,19 | 0,11 | 37,17 | 0,000 |
| X ₁ (L) | 0,56 | 0,14 | 4,06 | 0,001 |
| X ₁ (Q) | -0,51 | 0,16 | -3,09 | 0,007 |
| X ₂ (L) | 0,28 | 0,14 | 2,05 | 0,057 |
| X ₂ (Q) | -0,34 | 0,16 | -2,08 | 0,054 |
| X ₁ . X ₂ | 0,12 | 0,20 | 0,63 | 0,537 |

X₁: pH; X₂: temperatura; L: efeito linear; Q: efeito quadrático

Tabela 3 Coeficientes de regressão obtidos a partir do Delineamento Composto Central
Rotacional

| Fonte de variação | Coeficiente de Regressão | Erro padrão | t (21) | p |
|---------------------------------|--------------------------|-------------|--------|-------|
| Média | 4,19 | 0,11 | 37,17 | 0,000 |
| X ₁ (L) | 0,28 | 0,07 | 4,06 | 0,001 |
| X ₁ (Q) | -0,25 | 0,08 | -3,09 | 0,007 |
| X ₂ (L) | 0,14 | 0,07 | 2,05 | 0,057 |
| X ₂ (Q) | -0,17 | 0,08 | -2,08 | 0,054 |
| X ₁ . X ₂ | 0,06 | 0,10 | 0,63 | 0,537 |

X₁: pH; X₂: temperatura; L: efeito linear; Q: efeito quadrático

APÊNDICE E

ARTIGO 7: PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE LIPASES E BIOSURFACTANTES ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA E EM ESTADO SÓLIDO

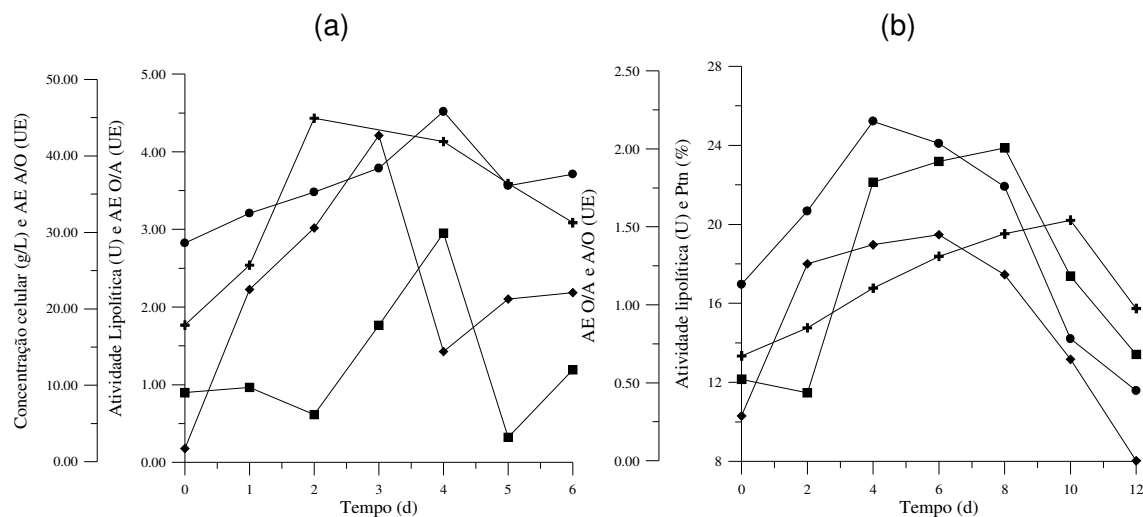


Figura 1 Atividade lipolítica (AL), atividade emulsificante óleo em água (AE O/A) e água em óleo (AE A/O) e crescimento fúngico (X e % proteínas) para as fermentações (a) submersa e (b) em estado sólido, utilizando os fungos *Aspergillus* cepas O-8 e O-4, respectivamente.

(●) Atividade Lipolítica; (■) AE O/A; (◆) AE A/O; (+) Crescimento fúngico

APÊNDICE F:
MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DOS FUNGOS MAIORES
PRODUTORES DE LIPASES

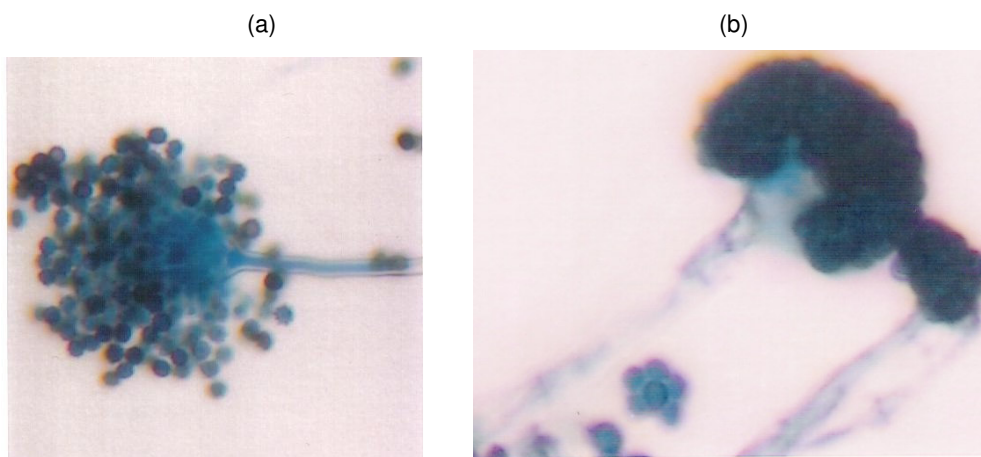


Figura 1 Micrografias eletrônicas dos micélios dos fungos *Aspergillus* O-4 (a) e *Aspergillus* E-6 (b), maiores produtores de lipases via fermentação em estado sólido

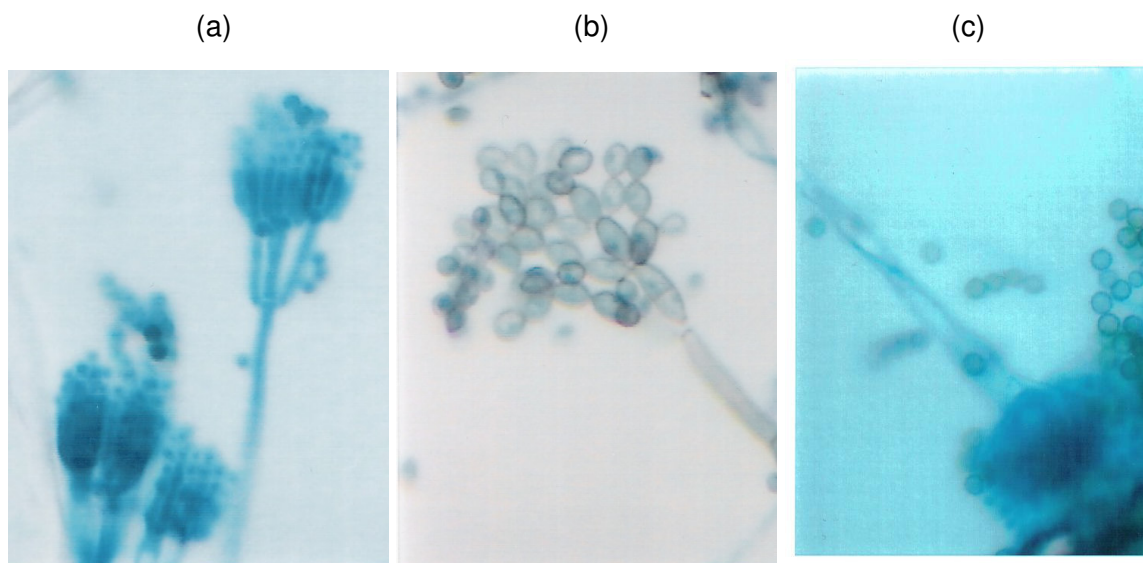


Figura 2 Micrografias eletrônicas dos micélios dos fungos *Penicillium* E-3 (a), *Trichoderma* E-19 (b) e *Aspergillus* O-8, maiores produtores de lipases via fermentação submersa

APÊNDICE G:
ARTIGO PUBLICADO: SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS
PRODUTORES DE LIPASES ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO