UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

Seleção de fungos termofílicos para produção de lípase e aplicação na produção de biodiesel

ANA LÚCIA FERRAREZI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada.

FEVEREIRO - 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

Seleção de fungos termofílicos para produção de lípase e aplicação na produção de biodiesel

ANA LÚCIA FERRAREZI

Orientadora: Eleni Gomes
Co-orientador: Gustavo O. Bonilla-Rodriguez

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada.

FEVEREIRO - 2011

547.758 Ferrarezi, Ana Lúcia
F374s Seleção de fungos termofílicos para produção de lipase e aplicação na produção de biodiesel / Ana Lúcia Ferrarezi. - Rio Claro : [s.n.], 2011
165 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Eleni Gomes
Co-Orientador: Gustavo Orlando Bonilla Roddriguez

1. Enzimas. 2. Enzimas termofílicas. 3. Imobilização de células. 4. Fermentação. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

unesp **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

CAMPUS DE RIO CLARO

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Produção de lipases por fungos termofílicos imobilizados e a sua utilização para produção de Biodiesel por transesterificação

AUTORA: ANA LUCIA FERRAREZI

ORIENTADORA: Profa. Dra. ELENI GOMES

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. GUSTAVO ORLANDO BONILLA RODRIGUEZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIENCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA) , pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELENI GOMES
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto

Profa. Dra. HEIZIR FERREIRA DE CASTRO
Depto de Engenharia Quimica - Universidade de São Paulo

Prof. Dr. ERNANDES BENEDITO PEREIRA
Depto. de Farmácia e Biotecnologia - Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. HUMBERTO MÁRCIO SANTOS MILAGRE
Departamento de Bioquimica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Profa. Dra. TERESA CRISTINA ZANGIROLAMI
Departamento de Engenharia Química / Universidade Federal de Sao Carlos

Data da realização: 18 de fevereiro de 2011.

Dedico este trabalho aos meus pais,
minhas irmãs, e ao meu marido,
pois sempre me incentivaram
a continuar a caminhada.

"A verdadeira felicidade está na própria casa,
entre as alegrias da família."
(Leon Tolstoi)

"As grandes idéias surgem da observação dos pequenos detalhes."

(Augusto Cury)

Agradeço:

À Deus, por iluminar meus olhos diante dos pequenos detalhes e por colocar em meu caminho tantas pessoas importantes.

À Profª Drª Eleni Gomes, que me recebeu em seu grupo de pesquisa, pela orientação, incentivos e ensinamentos valiosos.

À minha família, meus pais Paulo e Cidinha, minhas irmãs Aline e Andressa, e meu marido Elison, por serem meu porto seguro nos momentos de tristeza, dificuldade e de alegrias.

Ás amigas queridas Bárbara M. Bonine, Tássia C. Egea, Débora N. Okamoto e Letícia M. Zamphorlim, pelo companheirismo e principalmente por sempre estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis dessa fase da minha vida.

Aos professores que colaboraram para o andamento desse projeto, Dr. Geraldo Nery, Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez e Dr. Roberto da Silva por valiosas contribuições ao longo do trabalho. À Profª Drª Heizir Ferreira de Castro por me receber de tão longe e me ensinar os caminhos para chegar ao misterioso Biodiesel e ao Prof. Dr. Mauricio Boscolo, que apesar do tempo escasso, está sempre disponível para infindáveis dúvidas.

À Profª Drª Dejanira de Franceschi de Angelis pela paciência e compreensão durante a disciplina Microbiologia e Bioquímica da Fermentação etanólica.

Aos meus novos companheiros na busca por enzimas Janaina Pires Borges e Thiago H. Kobe Ohe pela contribuição e o companheirismo de vocês que foram fundamentais para que tudo desse certo e aos mais novos integrantes do nosso grupo e não menos importantes, Bárbara Garcia, Rafaela Rodrigues de Brito, Jacqueline Shimizu e Pedro Henrique Vendramini.

A todos os companheiros do laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada pela maravilhosa convivência, risadas, baladinhas, bolos e almoço-terapia: Bárbara Bonine, Tássia, Fabiana, Natalia, Andréia, Ellen, Daniela, Carolina Merheb, Milla, Larissa, Rodrigo Simões Leite, Ariane Zanchetta, Gisele, Carolina Bezerra, Ricardo, Thiago, Josiane, Bárbara Garcia, Rodolfo, André, Ruan, Márcia, Cristiane e à Priscila e Rosângela mesmo não estando mais em nosso laboratório foram importantes na minha história.

Às amigas do laboratório de Bioquímica de proteínas Patrícia Peres Polizelli, Rejane Ouchi, Angélica Souza, Evandro Ricardi, Lílian Caroline Oliveira e Laís Ramires Mendicino pela longa convivência desde o mestrado, pelo carinho, amizade e companheirismo.

À Lívia Souza, Grazielle Silva e Poliana Tiosso que me receberam em Lorena e me ensinaram muito. Pelo companheirismo durante os 20 dias que fiquei com vocês, foi muito bom conhecê-las.

À FAPESP pelo imprescindível apoio financeiro.

"No fim tudo dá certo,
Se não deu certo
É porque ainda não
chegou ao fim."
(Fernando Sabino)

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência. Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida. Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um não. É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.”

(Augusto Cury)

RESUMO

As enzimas são catalisadores muito eficientes e de grande interesse na aplicação industrial. As lipases (E.C. 3.1.1.3) são serina-hidrolases que agem na hidrólise, esterificação e transesterificação de acilgliceróis de cadeia longa. Lipases microbianas têm sido amplamente usadas devido à sua especificidade. Na transesterificação moléculas de triacilglicerol reagem com um álcool na presença de um catalisador formando uma mistura de glicerol e ésteres de ácidos graxos. O biodiesel, definido como ésteres metílicos ou etílicos, tem atraído crescente interesse como uma fonte de energia renovável, substituindo o diesel produzido a partir de combustíveis fósseis. O presente trabalho tem como objetivo principal efetuar a prospecção de fungos termofílicos que apresentem produção significativa de lipase e, concomitantemente, atividade transesterificante. As linhagens foram selecionadas por detecção de atividade lipolítica em placas de ágar contendo Rodamina B, por fermentação submersa (FSm) e fermentação em estado sólido (FES). Foram testadas linhagens de fungos termofílicos da coleção do laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, sendo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, *Rhizomucor pusillus Myceliophtora* sp F2.1.4, *Myceliophtora* sp M7.7, F2.1.1, F2.1.3 e *Thermomyces lanuginosus* TO-05 os que mostraram um maior potencial hidrolítico. Estudos adicionais avaliaram a produção de lipase através da modificação da fonte de componentes nutricionais e algumas propriedades físicas na produção de lipase por *T. indicae-seudaticae* N31 em FSm, e por *R. pusillus* e *T. indicae-seudaticae* N31 em FES. Os estudos dos processos fermentativos foram bem sucedidos, havendo um aumento de 16 vezes na produção de lipase de *R. pusillus* e de 36 vezes na lipase de *T. indicae-seudaticae* N31, ambas em FES. A lipase de *T. indicae-seudaticae* N31 produzida em FSm e FES foram caracterizadas, a temperatura ótima foi a 40 ºC e a estabilidade em uma faixa de pH de 4 a 8, em ambas as enzimas. A lipase produzida em FSm apresentou pH ótimo 6-7 e se mostrou estável de 35 a 50 ºC, enquanto que a lipase produzida em FES apresentou pH ótimo ao redor de 3-4 e é termolábil. Os fungos: *T. indicae-seudaticae* N31, *R. pusillus, Myceliophtora* sp M7.7, F2.1.1, F2.1.3 e *T. lanuginosus* TO-05 foram selecionados e suas hifas imobilizadas em bucha vegetal por meio de fermentação semi-sólida, e testadas na esterificação e transesterificação. As lipases das hifas imobilizadas apresentaram maiores valores de atividade hidrolítica para todos os fungos quando comparadas com as produzidas em FSm e FES. As hifas imobilizadas foram submetidas à esterificação (ácido oléico e etanol, ácido butírico e n-butanol) e observamos que todos os fungos testados apresentaram atividade. No entanto, *R. pusillus e Myceliophtora* sp M7.7 apresentaram altos rendimentos na conversão de ácido oléico em etil oleato, sendo o rendimento de 80 e 70%, respectivamente.

Assim, esses dois fungos foram selecionados e as suas hifas imobilizadas foram submetidas a transesterificação. É notável que somente as hifas imobilizadas de *R. pusillus* produziram ésteres na presença de óleo de canola e de soja, com rendimento de apenas 11 e 12%, respectivamente. Entretanto, acreditamos ser importante o estudo das condições da reação na tentativa de aumentar o rendimento, já que muitos fatores podem ser determinantes neste tipo de reação.

Palavras-chave: Lipase. Fermentação em estado sólido. Fermentação submersa. Enzimas termofílicas. Imobilização de células. Biodiesel.

ABSTRACT

Enzymes are efficient catalysts and interesting for industrial applications. Lipases (EC 3.1.1.3) constitute a group of serine hydrolases that catalyze the hydrolysis, esterification and transesterification reactions of long chain acylglycerols. Microbial lipases have been widely used for biotechnological applications due to their specificity. In transesterification, molecule of a tryacylglicerol react with an alcohol in the presence of catalyst, producing a mixture of fatty esters and glycerol. Biodiesel, defined as methyl or ethyl fatty esters and has attracted considerable attention as a renewable source of energy, in substitution of fossil fuels. The main goal of the present work is the screening of thermophilic fungi that present outstanding lipase production and in parallel able to perform transesterification reaction. Strains were screened for lipase activity on agar plates containing Rhodamine B, for submerged fermentation (SmF) and solid state fermentation (SSF). The tested thermophilic strains were from the collections of the Biochemistry and Applied Microbiology Laboratory, where *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, *Rhizomucor pusillus Myceliophtora* sp F2.1.4, *Myceliophtora* sp M7.7, F2.1.1, F2.1.3 and *Thermomyces lanuginosus* TO-05 had the highest lipase production. Additional studies attempted to improve lipase production by nutrient source modifications and physicals conditions in FmS by *T. indicae-seudaticae* N31 and in FSS by *T. indicae-seudaticae* N31 and *R. pusillus*. The fermentations studies were successful, with a 16 fold enhancement in lipase yield compared to the initial medium from lipase *R. pusillus* and 36 fold for the lipase *T. indicae-seudaticae* N31, both in FES. The lipase from *T. indicae-seudaticae* N31 cultured in SSF and SmF, exhibited maximum lipolytic activity at 40 ºC and stability for the pH range from 4 to 8. The enzyme produced by FmS presented maximum activity at pH 6-7 and thermostable at 35-50 ºC, whereas the lipase from FSS displayed an optimum pH around 3-4 and thermal lability. The fungi *T. indicae-seudaticae* N31, *R. pusillus, Myceliophtora* sp M7.7, F2.1.1, F2.1.3 and *T. lanuginosus* TO-05 were selected and their hyphae immobilized in loofa sponges in FmS and tested in esterification and transesterification reactions. The lipases from immobilized hyphae displayed higher hydrolytic activity for all the tested fungi when compared to those produced by FmS and FSS. Immobilized hyphae were submitted to esterification (oleic acid and ethanol, butyric acid and ethanol-butanol), and we observed that all the tested fungi presented activity. However, *R. pusillus and Myceliophtora* sp M7.7 showed high yields of 80 and 70%, respectively, for the conversion from oleic acid to ethyl oleate. Accordingly, both immobilized fungi were selected and tested for transesterification. Remarkably, only *R. pusillus* cells showed esters in the presence of canola and soybean oils, with yields of only 11

and 12% respectively. However, we believe that it is important to study the reaction conditions in an attempt to improve ester production, since many factors can be decisive in this type of reaction.

Key words: Lipase. Solid state fermentation. Submerged fermentation. Thermophilic enzymes. Immobilized Cells. Biodiesel.

APRESENTAÇÃO

O objetivo do trabalho foi padronizar metodologias e selecionar cepas fúngicas termofílicas com capacidade de produzir enzimas lipolíticas com propriedade de transesterificação e testá-las na produção de biodiesel.

Assim, o presente trabalho foi dividido em 5 capítulos. Neste primeiro capítulo são introduzidos os principais itens do trabalho apresentados em uma revisão bibliográfica sobre o tema da pesquisa abordando aspectos sobre as lipases, aplicações biotecnológicas dessas enzimas e lipases termoestáveis, aplicação das lípases na produção de biodiesel e imobilização. Os capítulos 2 e 3 tratam especificamente dos resultados relacionados à seleção de fungos termofílicos produtores de lipase por fermentação submersa e fermentação em estado sólido. Nestes capítulos são apresentadas as linhagens testadas, e os resultados de produção das enzimas em testes de pré-seleção (detecção da atividade lipolítica em placa de petri) e pelas fermentações, ao qual são selecionados alguns fungos de interesse para dar continuidade ao trabalho.

No capítulo 4 apresentam-se os dados de caracterização bioquímica das lipases produzidas por *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, linhagem selecionada por apresentar resultados expressivos de produção da enzima tanto por fermentação submersa quanto por fermentação em estado sólido.

No capítulo 5 são apresentados os dados de imobilização das hifas fúngicas para realizadas com as linhagens selecionadas nos capítulos 2 e 3. Neste capítulo, também são mostrados os resultados obtidos aplicando-se as hifas imobilizadas na produção de biodiesel e as perspectivas para trabalhos futuros.

Ao final do trabalho são acrescentados 2 apêndices, no qual mostram alguns dados adicionais. No apêndice A, são apresentadas algumas tabelas e figuras que complementam o trabalho. O apêndice B trata-se da apresentação de algumas metodologias que foram necessárias a sua padronização e as melhores condições obtidas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Página

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 19
Figura 1. Representação da estrutura α/β-hidrolase e sítio catalítico das lípases..... 21
Figura 2. Sítio ativo da enzima..... 21
Figura 3. Representação esquemática das reações catalisadas pela lipase..... 22
Figura 4. Representação das reações catalisadas por lípases (Seletividade)..... 23
Figura 5. Mecanismo de ação das lípases..... 24
Figura 6. Exemplo de lipase na catalise de um intermediário quiral na síntese de fármacos..... 27
Figura 7. Representação da reação de transesterificação..... 31
Figura 8. Efeito da concentração da água na conversão de produtos de transesterificação enzimática e hidrólise..... 35
CAPÍTULO II – SELEÇÃO DE FUNGOS TERMOFÍLICOS PRODUTORES DE LIPASE EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA..... 47
Figura 1. Curva de lipase em função do tempo de cultivo de *T. indicae-seudaticae* N31. 58
Figura 2. Curva de lipase em função do tempo de cultivo de *Rhizomucor pusillus*..... 59
Figura 3. Curva de lipase em função do tempo de cultivo de *Aspergillus* sp T4.6.2..... 60
Figura 4. Curva de lipase em função do tempo de cultivo de *Aspergillus* sp T4.6.1..... 61
Figura 5. Curva de lipase em função do tempo de cultivo de *Aspergillus* sp T5.1.2..... 62
Figura 6. Curva de lipase em função do tempo de cultivo de *Bothryosphera rodhina*..... 63
Figura 7. Efeito da concentração de oleo de soja e de glicoses na produção de lipase em FSm..... 66
Figura 8. Efeito do pH inicial do meio de cultivo e da temperatura na produção de lipase em FSm..... 67
Figura 9. Zimograma SDS-PAGE..... 69
CAPÍTULO III – SELEÇÃO DE FUNGOS TERMOFÍLICOS PRODUTORES DE LIPASE EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO..... 74
Figura 1. Efeito da composição do substrato sólido e da quantidade de inoculo sobre a produção de lipase *Thermomucor indicae-seudaticae* N31..... 81
Figura 2. Efeito da composição do tipo de fonte de nitrogênio e sua concentração sobre a produção de lipase *Thermomucor indicae-seudaticae* N31..... 81
Figura 3. Efeito da composição da de fonte de carbono sobre a produção de lipase *Thermomucor indicae-seudaticae* N31..... 83
Figura 4. Efeito do Volume da solução nutriente sobre a produção de lipase *Thermomucor indicae-seudaticae* N31..... 84
Figura 5. Efeito do tipo e volume da solução de extração sobre a produção de lipase *Thermomucor indicae-seudaticae* N31..... 85
Figura 6. Efeito da temperatura sobre produção de lipase por FES pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31..... 87
Figura 7. Efeito da suplementação do meio de cultivo e da quantidade de inoculo sobre a produção de lipase por *Rhizomucor pusillus*..... 88
Figura 8. Efeito da suplementação de carbono e nitrogênio sobre a produção de lipase por *Rhizomucor pusillus*..... 89
Figura 9. Efeito da concentração de nitrogênio e açúcar no meio de cultivo sobre a produção de lipase por *Rhizomucor pusillus*..... 90
Figura 10. Efeito do tipo de óleo e volume de solução nutriente sobre a produção de lipase por *Rhizomucor pusillus*..... 91
Figura 11. Efeito do tipo e volume da solução de extração sobre a produção de lipase por *Rhizomucor pusillus*..... 92

Figura 12. Efeito da temperatura sobre a produção de lipase por FES pelo *Rhizomucor pusillus*..... 93
Figura 13. Zimograma SDS-PAGE..... 97
CAPÍTULO IV – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE LIPASES PRODUZIDAS POR FUNGOS TERMOFÍLICOS..... 102
Figura 1. Produção de lipase pelo *T. indicae-seudaticae* N31 em FES e FSm..... 107
Figura 2. Efeito do pH na atividade da lipase de *T. indicae-seudaticae* N31 produzida em FSm e FES..... 108
Figura 3. Efeito da Temperatura sobre a atividade da lipase de *T. indicae-seudaticae* N31 produzida em FSm e FES..... 109
Figura 4. Efeito da temperatura e do pH sobre a estabilidade da lipase de *T. indicae-seudaticae* N31 produzida em FSm..... 110
Figura 5. Efeito da temperatura e do pH sobre a estabilidade da lipase de *T. indicae-seudaticae* N31 produzida em FES..... 111
CAPÍTULO V – IMOBILIZAÇÃO DE HIFAS FÚNGICAS E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DO BIODIESEL..... 115
Figura 1. Medida dos cubos de bucha vegetal e esponja de polipropileno..... 118
Figura 2. Fermentação submersa com hifas imobilizadas..... 122
Figura 3. Bucha vegetal antes após a imobilização das hifas fúngicas 123
Figura 4. Curva de produção de lipase da hifa imobilizada de *Myceliophthora* sp F2.1.1 em bucha vegetal..... 124
Figura 5. *Myceliophthora* sp M7.7 imobilizado em bucha vegetal..... 124
Figura 6. Curva de produção de lipase da hifa imobilizada de *Myceliophthora* sp F2.1.3 em bucha vegetal..... 125
Figura 7. Curva de produção de lipase da hifa imobilizada de *Myceliophthora* sp M7.7 bucha vegetal..... 126
Figura 8. Curva de produção de lipase da hifa imobilizada de *Rhizomucor pusillus* em bucha vegetal..... 127
Figura 9. Atividade de lipase do meio de cultura líquida da FSm de *Rhizomucor pusillus*..... 127
Figura 10. Curva de produção de lipase da hifa imobilizada de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em bucha vegetal..... 128
Figura 11. Curva de produção de lipase da hifa imobilizada de *Thermomyces lanuginosus* TO-05 em bucha vegetal..... 129
Figura 12. Atividade de esterificação catalisada por lipases presentes nas hifas imobilizadas de fungos termofílicos..... 131
Figura 13. Rendimento das reações de esterificação catalisadas por lipases presentes nas hifas imobilizadas de fungos termofílicos, analisadas por CG..... 132
Figura 14. Hidrólise na presença de vários óleos..... 133
Figura 15. Cromatograma da análise da transesterificação catalisada pela hifa de *R. pusillus* imobilizada em bucha..... 134
APÊNDICE A: Figuras e Tabelas..... 141
Figura 1A. Detecção da atividade lipolítica em placa em diferentes meios..... 142
Figura 2A. Detecção da atividade de lipase em placa pelos fungos isolados do ambiente..... 143
Figura 3A. Detecção da atividade de lipase em placa de fungos coletados e isolados do ambiente..... 143
Figura 4A. Efeito de variáveis no meio nutriente, usado durante o processo de fermentação submersa pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31..... 144
Figura 5A. Efeito de variáveis no meio nutriente, usado durante o processo de 145

fermentação submersa pelo *Rhizomucor pusillus*.....
Figura 6A. Cromatograma ilustrando os tempos de retenção dos padrões nas condições ideais no cromatógrafo gasoso..... 145
APÊNDICE B: Padronização de Metodologias..... 146
Figura 1B. Efeito da variação da concentração de Triton X-100 na atividade de lipase de *Aspergillus* sp T4.6.2..... 148
Figura 2B. Efeito da variação da concentração de isopropanol na atividade de lipase de *Aspergillus* sp T4.6.2..... 148
Figura 3B. Avaliação da atividades de lipase por duas metodologias diferentes..... 150
Figura 4B. Perfil obtido na análise do padrão de etil éster na presença de lipase de *T. indicae-seudaticae* N31 analisadas em HPLC..... 151
Figura 5B. Perfil de transesterificação pela lipase de F5.1.3..... 152
Figura 6B. Perfil de transesterificação pela lipase de *Myceliophthora* sp F2.1.3..... 153
Figura 7B. Perfil de transesterificação pela lipase Comercial de *Rhizomucor miehei*..... 154
Figura 8B. Representação esquemática da preparação de microesferas de quitosana por precipitação em meio alcalino..... 155
Figura 9B. Teste realizado para escolha do solvente, etil oleato foi usado como padrão.. 159
Figura 10B. Cromatograma correspondente ao controle da reação..... 161
Figura 11B. Cromatograma correspondente à reação com a Novozyme 435, como catalisador..... 161
Figura 12B. Cromatograma correspondente a reação com a enzima de *Candida rugosa* como catalisador..... 162
Figura 13B. Cromatograma correspondente a reação com a enzima de *Rhizomucor miehei* como catalisador..... 162
Figura 14B. Cromatograma correspondente a reação com a enzima de pâncreas de porco como catalisador..... 163

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
Tabela 1. Aplicações industriais de lipases microbianas.....	26
Tabela 2. Relação de algumas lípases que são utilzadas nas formulações de alguns detergentes.....	27
Tabela 3. Temperatura e pH ótimos de atividade de algumas lipases microbianas.....	29
CAPÍTULO II – – SELEÇÃO DE FUNGOS TERMOFÍLICOS PRODUTORES DE LIPASE EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	47
Tabela 1. Relação de fungos testados na detecção da atividade lipolítica em placa.....	53
Tabela 2. Efeito da variação da glicose e da concentração de Tween 80 na produção de lipase em FSm.....	56
Tabela 3. Precipitação do extrato bruto da lipase de *T. indicae-seudaticae* N31 produzida por FSm.....	68
CAPÍTULO III – SELEÇÃO DE FUNGOS TERMOFÍLICOS PRODUTORES DE LIPASE EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	74
Tabela 1. Relação dos fungos testados em FES.....	79
Tabela 2. Precipitação do extrato bruto da lipase de *T. indicae-seudaticae* N31 produzida por FES.....	96
CAPÍTULO V – IMOBILIZAÇÃO DE HIFAS FÚNGICAS E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DO BIODIESEL.....	115
Tabela 1. Dados obtidos da curva de calibração.....	120
Tabela 2. Comparação entre os diferentes processos de fermentação utilizados para a produção de lipase	130
Tabela 3. Rendimento da reação de transesterificação catalisada pela hifa de *R. pusillus* imobilizada em bucha.....	135
APÊNDICE B: Padronização de Metodologias.....	146
Tabela 1B. Apresenta a composição das reações de transesterificação testadas.....	150
Tabela 2B. Atividade das lipases imobilizadas em PHB e quitosana.....	157
Tabela 3B. Atividade e umidade das lipases imobilizadas em PHB (poli-hidroxibutirato) e quitosana.....	157
Tabela 4B. Protocolo de corrida do HPLC de fase reversa.....	159

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
Lípases.....	20
Aplicações biotecnológicas das lIpases.....	25
Lipases termoestáveis.....	28
Aplicação de Lipases na produção de biodiesel.....	30
Imobilização.....	36
Referencias.....	38
CAPÍTULO II – SELEÇÃO DE FUNGOS TERMOFÍLICOS PRODUTORES DE LIPASE EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	47
II.1 Introdução.....	48
II.2 Objetivos.....	49
2.1 Objetivos específicos.....	49
II.3 Materiais e Métodos.....	49
3.1 Seleção de Microrganismos Termofílicos.....	49
3.2 Meios de cultura	49
3.3 Detecção da atividade lipolítica em placas de Petri.....	50
3.4 Fermentação Submersa (FSm).....	50
3.4.1 Efeitos das concentrações de glicose e óleo de soja dos meios na produção de lipase por FSm.....	51
3.4.2 Efeitos da temperatura e pH sobre a produção de lipase em FSm.....	51
3.5 Quantificação da atividade de lipase por hidrólise de sustrato cromogênico.....	51
3.6 Proteína Total.....	52
3.7 Precipitação.....	52
3.8 Eletroforese.....	52
II.4 Resultados e Discussão.....	53
4.1 Detecção da atividade lipolítica em placas de Petri.....	53
4.2 Produção de lípases em Fermentação Submersa (FSm).....	55
4.2.1 Efeito do tempo de cultivo na produção de lipase pelos fungos selecionados em FSm.....	56
4.3 Efeito das variações das condições de Fermentação submersa sobre a produção de lipase por *T. indicae-seudaticae* N31.....	65
4.4 Precipitação e SDS-PAGE.....	67
II.5 CONCLUSÃO.....	69
II.6 REFERÊNCIAS.....	70
CAPÍTULO III – SELEÇÃO DE FUNGOS TERMOFÍLICOS PRODUTORES DE LIPASE EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	74
III.1 Introdução.....	75
III.2 Objetivos.....	75
2.1 Objetivos específicos.....	75
III.3 Materiais e Métodos.....	76
3.1 Seleção de Microrganismos Termofílicos.....	76
3.2 Meios de cultura.....	76
3.3 Fermentação em estado sólido (FES).....	76
3.3.1 Estudo da variação das condições de FES sobre a produção de lipase.....	77
3.4 Quantificação da atividade de lipase por hidrólise de sustrato cromogênico.....	77
3.5 Proteína Total.....	78
3.6 Precipitação.....	78

3.7 Eletroforese..... 78
III.4 Resultados e Discussão..... 79
4.1 Fermentação em Estado Sólido (FES)..... 79
4.2 Estudo das condições da Fermentação em Estado Sólido por *T. indicae-seudaticae* N31 e *Rhizomucor pusillus*..... 80
4.3 Precipitação e SDS-PAGE..... 95
III.5 Conclusão..... 97
III.6 Referências..... 99
CAPÍTULO IV – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE LIPASES PRODUZIDAS POR FUNGOS TERMOFÍLICOS..... 102
VI.1 Introdução..... 103
VI.2 Objetivos..... 104
2.1 Objetivos específicos..... 104
VI.3 Materiais e Métodos..... 104
3.1 Seleção de Microrganismos Termofílicos..... 104
3.2 Meios de cultura..... 104
3.3 Fermentação Submersa (FSm)..... 105
3.4 Fermentação em estado sólido (FES)..... 105
3.5 Quantificação da atividade de lipase por hidrólise de sustrato cromogênico..... 105
3.6 Efeito da Temperatura e pH ótimos..... 106
3.7 Efeito da Estabilidade em pH e Temperatura..... 106
IV.4 Resultados e Discussão..... 106
Caracterização bioquímica das lipases do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 produzidas por FSm e FES..... 106
IV.5 Conclusão..... 112
IV.6 Referências..... 113
CAPÍTULO V – IMOBILIZAÇÃO DE HIFAS FÚNGICAS E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DO BIODIESEL..... 115
V.1 Introdução..... 116
V.2 Objetivos..... 116
2.1 Objetivos específicos..... 117
V.3 Materiais e Métodos..... 117
3.1 Meios de cultura..... 117
3.2 Fermentação semi-sólida e imobilização das hifas..... 117
3.3 Quantificação da atividade de lipase hidrolítica por titulometria..... 118
3.4 Reação de Esterificação..... 119
3.5 Reação de Transesterificação..... 120
3.6 Análise dos ésteres por Cromatógrafia Gasosa (CG)..... 120
V.4 Resultados e Discussão..... 121
4.1 Imobilização das hifas fúngicas..... 121
4.2 Seleção das hifas imobilizadas pela esterificação..... 130
4.3 Transesterificação..... 133
V.5 Conclusão..... 136
V.6 Referências..... 137
APÊNDICE A: Figuras e Tabelas..... 141
APÊNDICE B: Padronização de Metodologias..... 146
Padronização de metodologias..... 147
1. Quantificação de atividade de lipase..... 147
1.1 Efeito da variação dos componentes do ensaio na metodologia de quantificação da atividade hidrolítica de lipase..... 147

1.2 Avaliação dos métodos propostos na quantificação da atividade hidrolítica de lipase..... 149
2. Ensaios de transesterificação..... 150
2.1 Padronização dos primeiros ensaios de transesterificação e esterificação..... 150
2.2 Padronização da transesterificação de lipases imobilizadas..... 155
3. Padronização da metodologia do HPLC..... 158
3.1 HPLC de Fase Reversa..... 158
3.2 Método de quantificação da atividade de transesterificação por HPLC..... 160
4. Outras Metodologias..... 163
4.1 Quantificação da atividade hidrolítica de lipase por titulometria..... 163
4.2 Reação de Transesterificação..... 164
4.3 Reação de Esterificação..... 164
5. Referências..... 166

CAPÍTULO I:

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Lipases

As enzimas possuem a função de catalisar reações nos sistemas biológicos podendo aumentar a velocidade de uma reação em até 10^{14} vezes. Atualmente, cerca de 4000 enzimas são conhecidas e destas, 200 são de interesse comercial sendo a maioria de origem microbiana (SHARMA et. al., 2001). As enzimas são classificadas de acordo com os tipos de reações que catalisam: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases.

Lipases (triacilglicerol acil hidrolases, EC 3.1.1.3) são serino-hidrolases que hidrolisam e modificam ligações carboxil éster de lipideos e seus derivados. As enzimas lipolíticas atuam em uma interface lipídio-água com ação importante sobre compostos insolúveis em água. Apresentam uma estrutura de α/β-hidrolase, pois são constituídas por α-hélices e folhas β (figura 1) (BORNSCHEUER, 2002; KHARE et. al., 2000; JOSEPH et al., 2008). A tríade catalítica é constituída por Ser-His-Asp/Glu. O resíduo de Serina atua como um nucleófilo, comum a todas as hidrolases e essencial para a catálise, e usualmente uma sequência consenso Gly-x-Ser-x-Gly que é encontrada ao redor da Serina do sítio ativo (BHARDWAJ et al., 2001; BORNSCHEUER, 2002; JOSEPH et al., 2008; NEUGNOT et al., 2002). A figura 2 ilustra a tríade catalítica da Calb A (*Candida antartica*) e a cavidade catalítica ocupada por uma molécula de palmitato (figura 2A) e *p*-nitrofenil palmitato (figura 2B) (ERICSSON et al., 2008). O sítio é composto por uma folha β central formada por 8 β (β1-β8) conectadas à seis α-hélices (A-F), a ligação do substrato à tríade catalítica é localizada no topo da folha β central (CASTRO et al., 2004; PLEISS et al., 1998; JOSEPH et al., 2008). As esterases possuem uma estrutura bem semelhante às da lipase, mas apresentam uma seqüência motivo Gly-x-x-Leu que não é observada nas lipases. As esterases seguem o modelo cinético simples de Michaelis-Menten, ao qual refere-se à hidrolise de um substrato solúvel em meio aquoso, diferente das lipases que necessitam de uma concentração mínima de substrato para se atingir uma alta atividade, sendo um exemplo perfeito de catálise heterogênea. Essas enzimas podem ser diferenciadas também pelo substrato, lipases preferem substrato insolúvel em água, normalmente triacilglicerol composto por ácidos graxos de cadeia longa, enquanto que as esterases hidrolisam ésteres simples, ácidos graxos de cadeia curta (BORNSCHEWER, 2002; REIS et al., 2009).

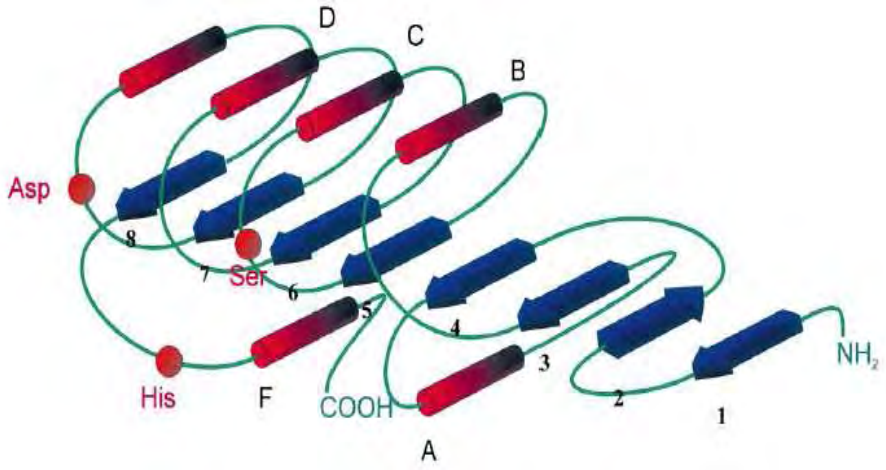


Figura 1. Representação esquemática da estrutura α/β-hidrolase e sítio catalítico das lipases (BORNSCHEUER, 2002).

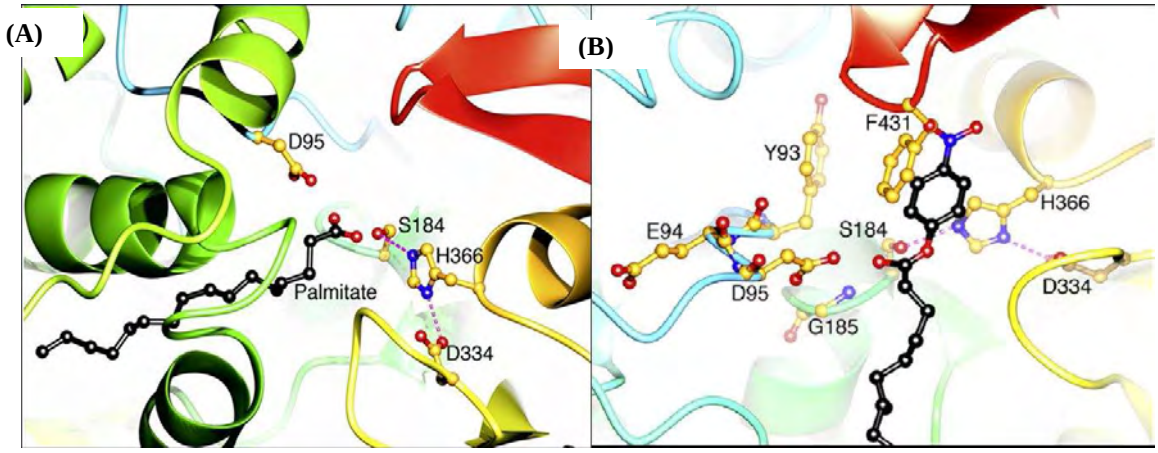


Figura 2. Sítio ativo da enzima, representado a Serina (S184), Histidina (H366) e Aspartato (D334) em dois ângulos diferentes, ilustrando o substrato na cavidade catalítica. **(A)** Palmitato; **(B)** *p*-nitrofenil palmitato; Estrutura tridimensional da Calb A de *Candida antarctica* (ERICSSON et al. 2008).

Outro fator para se distinguir as lipases das esterases, é que as primeiras exibem um aumento da atividade enzimática numa interface de lipídios insolúveis e água. Esse processo de ativação é conhecido como ativação interfacial, e acarreta em mudanças conformacionais na estrutura da enzima (ERICSSON et al., 2008). O fenômeno de ativação interfacial das lipases foi descrito pela primeira vez em 1936 por Holwerda e colaboradores, e depois em 1945 por Schonheyder e Volqvartz. Reações lipolíticas são fortemente dependentes da ativação interfacial, da cinética de difusão e partição de substratos, produtos e inibidores (REIS et al., 2009). A maioria das lipases também possui um domínio hidrofóbico denominado “tampa” que cobre o sítio catalítico da enzima. Desse modo, a enzima apresenta dois estados conformacionais, um é a forma fechada ou inativa e a outra é aberta ou ativa. Desnuelle e colaboradores postularam em 1960 que a ativação interfacial está associada a mudanças conformacionais da estrutura da lipase. A ativação interfacial resulta num rearranjo da estrutura, no qual a tampa aberta expõe o sítio ativo à ação do substrato. Isso só ocorre na presença de uma concentração mínima de substrato, como triglicerói s ou solventes orgânicos hidrofóbicos, ocorrendo a formação de micelas (BORNSCHEUER, 2002; PLEISS et al.,

1998; JOSEPH et al., 2008). Em estudos posteriores revelaram que a presença da “tampa” não está correlacionada com a ativação interfacial de todas as lípases. Em *Pseudomonas aeruginosa, Burkolderia glumae* e *Candida antarctica* B embora as lípases apresentem a “tampa” em sua estrutura não possuem ativação interfacial (CASTRO et al., 2004).

Além da hidrólise, as lipases possuem ferramentas para catalisar outros tipos reações, tais como esterificação, glicerólise, aminólise e transesterificação (figura 3) (JOSEPH et al., 2008; REIS et al., 2009). A transesterificação refere-se a troca de radicais acil entre um éster e um ácido (acidólise), um éster e outro éster (interesterificação) ou um éster e um álcool (alcoólise) (VILLENEUVE et al., 2000).

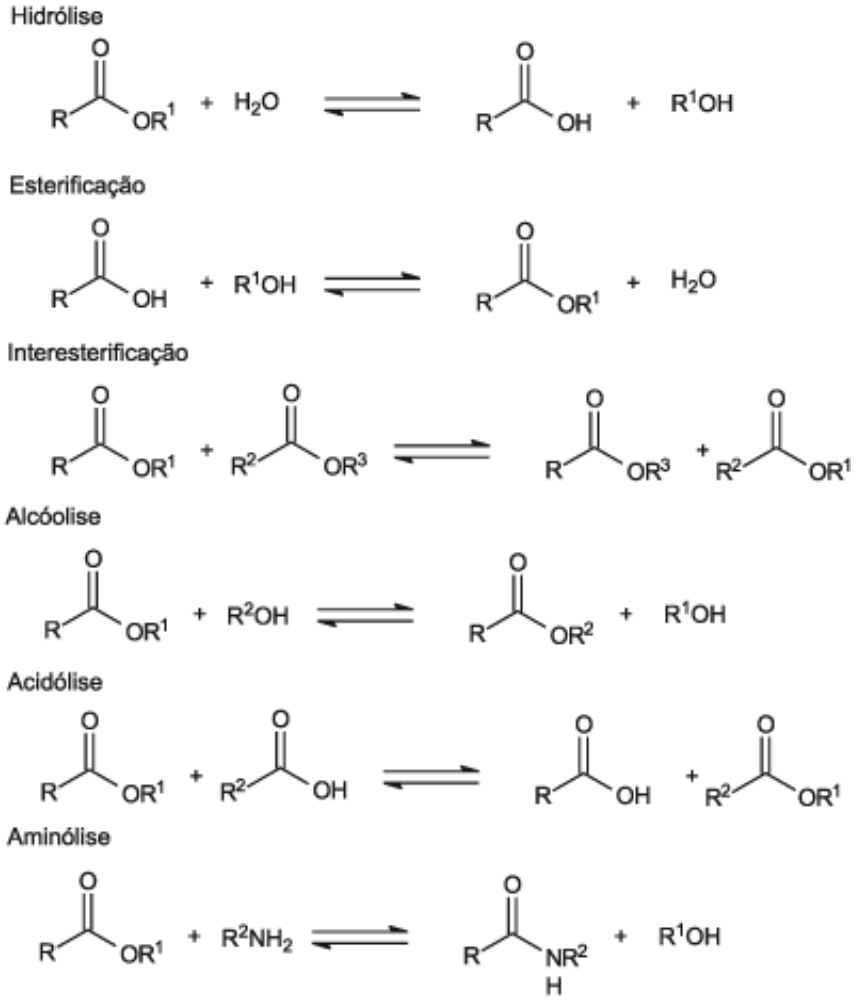


Figura 3. Representação das reações catalisadas pela lípase**:** Hidrólise, esterificação, interesterificação, alcóolise, acidólise, aminólise;

O tamanho e a geometria do substrato, e as condições da reação influenciam na especificidade da enzima por seu substrato (BROCA et al. 2003, JOSEPH et al., 2008). Essa especificidade consiste na capacidade que as lipases possuem de distinguir fatores estruturais das cadeias acil, como tamanho da cadeia, número, posição ou configuração de ligações duplas, presença de ramificações e natureza da fonte acil (ácidos graxos livres, ester alquil, glicerol ester etc) (ANTCZAK et al., 2009).

Essas características especiais das lípases são definidas como: alta especificidade ao substrato, quimio, régio e enantioseletividade. Também podem ser "tipo-seletivas", selecionam os substratos de acordo com o tamanho da cadeia de carbonos e/ou número de insaturações no grupamento acila (CASTRO-OCHOA et al, 2005; KADEMI et al., 2005; JOSEPH et al., 2008; PAQUES, MACEDO, 2006; SHARMA et al., 2001). O impedimento estérico e interações hidrofóbicas são forças determinantes da seletividade das lipases por álcool e ácidos graxos (CYGLER et al., 1994; REIS et al., 2009). Elas podem ser regioseletivas, ou seja, atuar numa posição específica da ligação éster e podem ser divididas em três tipos (figura 4) (BORNSCHEUER, 2002; PAQUES, MACEDO, 2006):

- 1,3-específica: hidrolisa ligação éster de ácidos graxos primários, liberando ácidos graxos na posição R1 ou R3 do triacilglicerol;
- 2-específica: hidrolisa as ligações éster na posição R2 do triacilglicerol;
- Não-específica: não distingue entre as posições da ligação éster para clivar, ou seja, hidrolisa ligação éster de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição R1, R2 ou R3 do triacilglicerol;

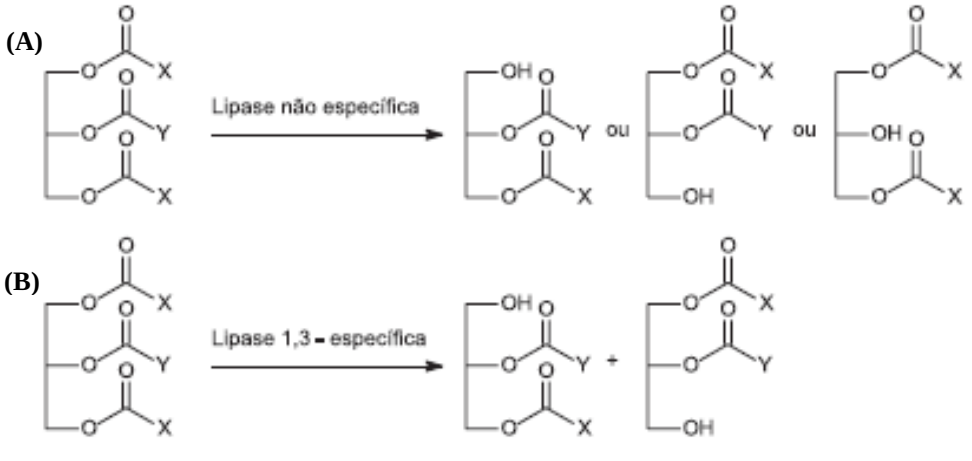


Figura 4. Representação esquemática das reações catalisadas por lípases tipo não-específica **(A)** e 1,3-específica **(B)**.

O mecanismo de ação da lipase (figura 5) é semelhante tanto para reações de hidrólise quanto para reações de síntese e acontece em etapas: (1) Primeiro o substrato entra no sítio ativo e sofre um ataque nucleofílico ao carbono da carbonila na ligação éster do substrato pelo oxigênio da Serina (Ser 184), que é ativada com a retirada de um próton pelo par Histidina/Aspartato (His366/Asp334), resultando em um arranjo intermediário tetraédrico 1 estabilizado pelos resíduos de Histidina e Aspartato e por ligações de hidrogênio com a Glicina (Gly185) e pela cadeia protonada de outro resíduo de Aspartato (Asp95). A Histidina doa um próton para a região alcoólica do substrato e um álcool é liberado formado um complexo acil-enzima (2). A Histidina aumenta a nucleoficidade de uma molécula de água ou álcool, ao qual exercem um ataque nucleofílico ao carbono da carbonila do resíduo ácido do substrato, formando um novo intermediário tetraédrico 2 (3). A histidina doa um próton para o oxigênio serínico, liberando os ésteres ou ácidos graxos e regenerando a enzima (4) (BORNSCHEUER, 2002; ERICSSON et al., 2008; REIS et al., 2009).

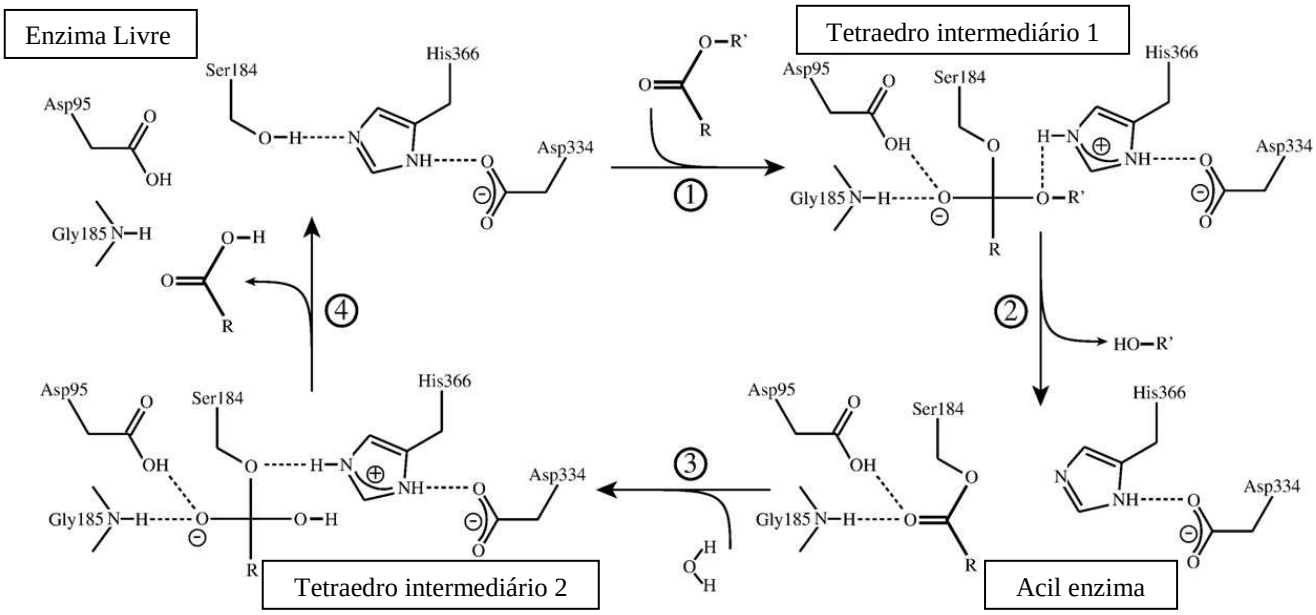


Figura 5 – Mecanismo de ação das lipases (ERICSSON et al., 2008).

As lipases estão envolvidas em funções fisiológicas da maioria dos micro-organismos, como no caminho metabólico do processamento de fontes de carbono, na patogenicidade e na detoxificação de biocidas (PRIM et al., 2003).

A capacidade hidrolítica das lípases é conhecida há mais de 300 anos, e a sua capacidade de síntese foi reconhecida há 70 anos atrás. Claude Bernard foi o primeiro a descobrir, em 1856, a lipase pancreática e percebeu que ela hidrolisava óleos insolúveis

(HASAN et al., 2006).

Entre os micro-organismos, os fungos e as leveduras são considerados importantes produtores de lipases, que geralmente são extracelulares. Enzimas microbianas são mais utilizadas devido à grande variedade de atividade catalítica disponível, maior rendimento, fácil manipulação genética, ausência de flutuações sazonais, rápido crescimento microbiano em meios de cultura de baixo custo (HASAN et al., 2006). As enzimas lipolíticas comerciais, geralmente, são obtidas de *Rhizopus delemar* (ESPINOSA et al. 2005; CRUZ et al. 1993; SHIMADA et al. 1996), *Humicola lanuginosa* (MORINAGA et al. 1986, IVANOVA et al. 2002), *Penicillium chrysogenum* (FERRER et al., 2000), *Fusarium heterosporum* (NAGAO et al. 1998), *Rhizopus chinensis* (NAKASHIMA et al. 1988) e *Candida rugosa* (OBRADORS et al., 1993). A maioria das lipases microbianas são do tipo ácidas ou neutras (HASAN et al., 2009, IIZUMI et al., 1990). Lipases microbianas com propriedades alcalinas e termofílicas têm sido relatas em *Alcaligenes* sp (HASAN et al., 2009, KAKUSHO et al., 1998), *Pseudomonas fragi* (HASAN et al., 2009, NISHIO et al., 1987), *P. nitroreducens* (HASAN et al., 2009, WATANABE et al. 1977). Novas aplicações vêm sendo desenvolvidas, baseadas nas características catalíticas dessas enzimas, especialmente na sua capacidade de catalisar reações de síntese em sistemas com baixa concentração de água (BANCERZ, GINALSKA, 2007; CIHANGIR, SARIKAYA, 2004).

Aplicações biotecnológicas das lipases

As lipases são largamente utilizadas no processamento de óleos e gorduras, como componentes de detergentes, na síntese de fármacos e cosméticos, síntese de biopolímeros, de biodiesel, e de produtos derivados do leite, na indústria alimentícia, agroquímicos e têxtil (HANSEN et al., 2006; PANDEY et al., 1999, JOSEPH et al., 2008). Podem ser usadas também para acelerar a degradação de resíduos de gordura (MASSE et al., 2001), sendo aplicadas principalmente em biorreatores, constituindo ferramentas importantes no tratamento de resíduos domésticos e industriais (BALCÃO et al., 1996; SHARMA et al., 2001; NYBROE et al., 1992). São considerados biocatalisadores importantes para a química orgânica e síntese de fármacos, devido ao seu grande potencial catalítico, e são muito usadas na indústria de química fina, especialmente na produção de aditivos alimentícios (compostos de sabor e aroma) (CIHANGIR, SARKAYA 2004; FOREST et al., 2008; STRAATHOF et al., 2002). A tabela 1 resume algumas das aplicações mais importantes de lipases microbianas (TREVISAN, 2004):

Tabela 1: Aplicações industriais de lipases microbianas.

Indústria	*Ação catalítica*	*Produto ou Aplicação*
Detergentes	Hidrólise de gordura	Remoção de manchas de óleo de tecidos
Lacticínios	Hidrólise de gordura, amadurecimento de queijo	Desenvolvimento de sabor em leite, queijo e manteiga
Panificação	Hidrólise, melhoria do sabor	Prolongamento do tempo de prateleira
Bebidas	Hidrólise, melhoria do aroma	Bebidas
Molhos	Hidrólise, melhoria da qualidade	Maionese, molhos e coberturas
Frigoríficos	Hidrólise, desenvolvimento do sabor	Derivados de carne e peixe, remoção de gordura
Óleos e gorduras	Transesterificação, hidrólise	Manteiga de cacau, margarina, glicerol, mono e diglicerídeos
Produtos químicos	Enantioseletividade, síntese	Intermediários quirais, produtos químicos
Produtos farmacêuticos	Transesterificação, hidrólise	Lipídeos especiais, auxiliares digestivos
Cosméticos	Síntese	Emulsificantes, hidratantes
Couro	Hidrólise	Produtores de couro
Papel	Hidrólise	Papel de melhor qualidade

O comportamento químio- régio- e enantioespecífico das lipases tem provocado grande interesse por cientistas e indústrias. Alguns processamentos de químicos manufaturados usando óleos e gorduras têm sido desenvolvidos com maior rapidez, maior especificidade e em condições mais amenas devido à atuação das lipases (HANSAN et al., 2006; SAXENA et al., 2003). Especificidade posicional, especificidade de ácido graxo, termoestabilidade e pH são as principais características que tornam essas enzimas com grande potencial de aplicação tecnológico.

O mercado global da indústria enzimática foi estimado em 2 bilhões de dólares em 2004. E o crescimento anual foi estimado em 4 a 5% AAGR até 2009 (Average Annual Growth Rate – taxa de crescimento anual). No entanto, estima-se que o mercado enzimático irá atingir 7 bilhões em 2013, com um crescimento anual de 6,3%, especialmente na industria farmacêutica e na utilização da enzima como biocatalisadores. Proteases, amilases, lipases e celulases são as enzimas mais utilizadas nas indústrias, sendo que as proteases e amilases lideram o mercado com 25% e 20%, respectivamente (HASAN et al., 2006 e 2010). Nas ultimas duas décadas houve um aumento significativo na utilização de lipases em aplicações biotecnológicas, e entre os processos bioquímicos relatados na literatura, 35% das enzimas empregadas referem-se às lipases (HASAN et al., 2010; PAQUES, MACEDO, 2006).

O uso de lipase no mercado de detergentes e cosméticos foi esperado um crescimento de 9,13% entre os períodos de 2001 a 2010. É estimado que anualmente, mil toneladas de

lipases serão adicionadas em aproximadamente 13 bilhões de toneladas de detergentes (HASAN et al., 2010).

A primeira lipase comercial, Lipolase, foi introduzida no mercado pela Novozyme em 1994. Essa enzima foi produzida pelo *Humicola lanuginosus* e expressa em *Aspergillus oryzae* (HOQ et al, 1985). A Novo também foi responsável pela produção da enzima que constitui a formulação do detergente LipoPrime®. Outros tipos de enzima também são utilizadas na constituição de detergentes, como as amilases, celulases, manases e principalmente as proteases alcalinas e subtilisinas. A tabela 2 mostra a relação de algumas lipases que são utilizadas em formulações de detergentes (HASAN et al., 2010).

Tabela 2. Relação de algumas lípases utilizadas nas formulações de alguns detergentes (JAEGER, REETZ, 1998; KUMAR et al., 1998).

Nome comercial	***Micro-organismo***	**Fabricante**
Lipolase	Enzima recombinante de *H. lanuginosus* expressa em *A. oryzae*.	Novozyme, Dinamarca.
Lumafast	Enzima recombinante de *Pseudomonas mendocina* expressa em *Bacillus* sp.	Genencor International, USA.
Lipomax	*Pseudomonas alcaligenes*.	Genencor International, USA.
Lipofast	Não divulgado.	Advanced Biochemicals, Índia.

Fármacos, agro-químicos, compostos quirais complexos apresentam síntese elaborada. A utilização de biocatalisadores facilitou a produção de enantiômeros puros, um dos principais fatores que expandiu a utilização de enzimas nessa área. Novas lipases enantioseletivas estão sendo usadas na catálise da síntese de medicamentos terapêuticos. Como exemplo, podemos citar a lipase de *Pseudomonas* AK que foi utilizada na síntese de um composto quiral intermediário (2) que gera como produto um potente agente anti-tumoral (epotilona) (figura 6) (JAEGER, EGGERT, 2002).

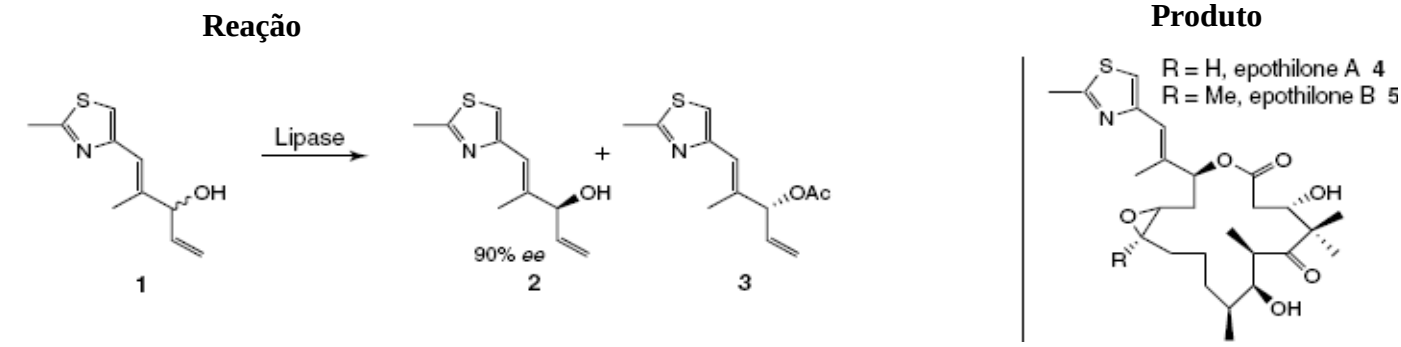


Figura 6. Atuação de lipases na catalise de um intermediário quiral (2) na síntese de fármacos.

Devido à vasta aplicação das lípases, novos micro-organismos estão sendo isolados na busca por lipases microbianas com propriedades diferenciadas. Os micro-organismos produtores de lipases têm sido encontrados em diversos hábitats, como resíduos industriais, indústrias de óleos vegetais, lacticínios, solo contaminado com óleo, sementes oleaginosas e alimentos em decomposição (HASAN et al., 2010; TREVISAN, 2004). O isolamento de micro-organismos termofílicos pode ser feito com sucesso a partir de solos, pilhas de compostagem e fontes termais (ANDERSCH et al., 1997).

Lipases termoestáveis

Enzimas termofílicas podem ser produzidas por micro-organismos termofílicos e mesofílicos. Lipases provenientes de micro-organismos termofílicos têm sido cada vez mais utilizadas, pois apresentam alta estabilidade e atividade em temperaturas altas, além de outras propriedades intrínsicas que conferem a elas estabilidade a agentes desnaturantes e a maiores variações de pH. Essas características fazem com que essas enzimas sejam ideais nos processos industriais e químicos, os quais podem ocorrer em temperaturas relativamente altas e na presença de solventes orgânicos (CASTRO-OCHOA et al, 2005; GOMES et al., 2007). Devido à sua estabilidade, as lipases termoestáveis podem ser usadas em sua forma de enzima nativa, em membranas de reator, imobilizadas covalentemente ou adsorvidas em resinas de troca iônica, cavidades fibrosas ou ligadas a cristais (ANDERSCH et al., 1997).

Várias vantagens são observadas ao se utilizar enzimas termofílicas: temperaturas mais altas podem ser aplicadas aos processos industriais, evitando a contaminação por micro-organismos mesofílicos; temperaturas mais elevadas nos processos reduz a viscosidade e aumenta a solubilidade do composto, o coeficiente de difusão dos substratos aumenta o rendimento dos processos e a reatividade.

Geralmente, enzimas termoestáveis são mais estáveis em presença de solventes e detergentes. Essas vantagens superam algumas desvantagens como a restrições no caso de substratos e produtos lábeis. (HAKI et al., 2003; HASAN et al., 2006).

A maioria das lipases termofílicas microbianas são ativas a 60ºC e pH 7, no entanto, as enzimas de algumas linhagens podem atuar em situaçõe extremas de pH e temperatura. A temperatura e o pH de algumas lipases estão destacados na tabela 3. Tolerância alcalina e termoestabilidades estão entre as principais características importantes comercialmente. Este ponto tem motivado uma busca continua por lipases que exibam características especiais, como estabilidade em relação a pH, temperatura, força iônica e solventes orgânicos (ABEL et al., 2000; HAKI et al., 2003; KULKURANI, GADRE, 1999).

Tabela 3. Temperatura e pH ótimos de atividade de algumas lipases e os respectivos micro-organismos produtores.

Micro-organismo	***Propriedades Enzimáticas***		**Referência**
	Temperatura ótima (ºC)	**pH ótimo**	
Bacillus sp. RSJ-1	50	8,0-9,0	Sharma et al. (2002)
Bacillus strin J 33	60	8,0	Nawani et al. (1998)
Bacillus stearothermophilus	68	--	Gupta et al. (1999)
Bacillus thermocatenletus	60-70	8,0-9,0	Klibanov (1983)
Bacillus thermoleovorans ID-1	70-75	7,5	Dong-Woo et al. (1999)
Geobacillus sp.	70	9,0	Abdel-Fattah (2002)
Pseudomonas sp.	65	9,6	Kulkurani and Gadre (1999)
Pseudomonas sp.	90	11,0	Rathi et al. (2000)
Pyrobaculum calidifontis	90	--	Hotta et al. (2002)
Pyrococcus horikoshii	97	5,6	Ando et al. (2002)
Pyrococcus horikoshii	95	7,0	Yan et al. (2000)

--Não avaliado pelos autores.

Análises moleculares de lipase têm sido realizadas no intuito de se entender a estrutura e atuação dessas enzimas, em especial das enzimas termofílicas, o que pode ajudar os pesquisadores na engenharia de novas lipases para aplicações biotecnológicas de acordo com a demanda e as necessidades das indústrias (HASAN et al., 2010).

Apesar de seqüências homólogas de proteínas mesofílicas e termofílicos serem bastante conservadas, algumas diferenças parecem influenciar na estabilização de proteínas termofílicas. Comparações entre as seqüências de aminoácidos dessas proteínas, indicaram a tendência de Gly serem substituídas por Ala e Lys por Arg nas termofílicas. Alto conteúdo de alanina em proteínas termofílicas sugere melhor formação no dobramento de α-hélices. Sugere-se que resíduos de Arg são mais bem adaptados à altas temperaturas do que Lys, devido ao seu alto pKa e estabilização de ressonância. Mais resíduos de aminoácidos carregados também são encontrados em termofílicos do que em mesofílicos, que apresentam maior quantidade de resíduos polares não carregados (especialmente Gln). Proteínas termofílicas também possuem um conteúdo um pouco maior de resíduos hidrofóbicos e aromáticos que as mesofílicas. Cisteínas são altamente sensíveis à oxidação em altas temperaturas, o que sugere uma menor quantidade na estrutura de proteínas termofílicas. Além da composição de resíduos de aminoácidos, a sua distribuição e interações também podem ser relevantes. Dill (1990) notou que efeitos de formação de pontes salinas, interações aromáticas e superfícies hidrofóbicas são fatores importantes na estabilização de α-hélices, estruturas importantes na estabilização de proteínas termofílicas. A possibilidade de aplicação

de enzimas termofílicas resulta de conhecimentos adquiridos pela biologia molecular e estudos bioquímicos, como purificação e caracterização de proteínas (VIEILLE, ZEIKUS, 2001).

A demanda por lipases termoestáveis vem crescendo nos últimos anos, por isso vários trabalhos vêm sendo publicados sobre estudos de purificação e caracterização dessas enzimas (ABRAMIC et al., 1999; HANDELSMAN, SHOHAN, 1998; HIOL et al., 1999; HIOL et al., 2000; IMAMURA, KITAURA, 2000; KIM et al., 1998; MOZHAEV et al., 1993; SUGIHARA et al., 1991; SUGIHARA et al., 1992, TRODLER et al., 2008).

Normalmente, as enzimas de fungos filamentosos e termofílicos podem ser produzidas por Fermentação submersa (FSm), Fermentação em estado sólido (FES) ou por fermentação semi-sólida. A FSm é a utilização de meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis, sendo esse processo o mais utilizado na produção de lípases (MARTINS, 2001; ALONSO, 2001). Fermentação em estado sólido (FES) caracteriza-se pelo uso de substrato sólido, que pode ser fonte de nutriente e/ou suporte de crescimento microbiano, com ausência de água entre as partículas (SINGHANIA et al, 2009). Fermentação semi-sólida, por sua vez, é um termo muitas vezes usado como sinônimo de FES, porém, como definição de uma terminologia diferencial será aqui considerado como o uso de substrato sólido como suporte para o crescimento microbiano, porém, estando os nutrientes minerais e fontes de carbono solúveis em meio líquido. (MATEOS-DIAZ et al., 2006; SUN, XU, 2008).

Esses três processos fermentativos têm suas vantagens e desvantagens em relação aos componentes usados como fontes de nutriente para o micro-organismo, ao controle operacional e dos parâmetros fermentativos. A escolha de um processo ou outro depende do propósito da fermentação, da adaptação do micro-organismo ao sistema usado, do tipo de produto que se quer obter e da pureza esperada.

Aplicação de Lipases na produção de biodiesel

Há 100 anos, Rudolf Diesel testou óleos vegetais como combustíveis de motores. Nas décadas de 30 e 40, óleos vegetais eram utilizados em motores em situações emergenciais. Entretanto, o uso direto destes óleos nos motores é considerado insatisfatório, pois apresentam alguns problemas como alta viscosidade, elevado índice de acidez e deposição de compostos de carbono. Recentemente, com o aumento do preço do óleo cru e a reserva limitada de combustíveis fósseis, aliada ao aumento da poluição do ar e à magnitude dos problemas de aquecimento global causado pelo excesso de CO presente na atmosfera, tem se intensificado a busca por fontes alternativas de combustíveis, como o biodiesel. O biodiesel pode diminuir a

emissão de compostos tóxicos como CO e SO_x (HARDING et al., 2007; FANGRUI et al., 1999; FUKUDA et al., 2001).

O biodiesel é um combustível proveniente de uma fonte energética renovável, que é produzido convertendo-se moléculas de triacilglicerol dos óleos vegetais em metil ou etil éster de cadeia longa, por meio de reações de transesterificação com uso de catalisadores químicos como ácidos ou bases (ANTCZAK et al., 2009; JAEGER, EGGERT, 2002).

Craqueamento térmico (ou pirólise), microemulsão e transesterificação são os processos que podem ser utilizados para a produção do biodiesel. Os dois primeiros processos apresentam um alto custo e geram biodiesel de baixa qualidade. Assim, a transesterificação é o procedimento mais usual na síntese de biodiesel (ROBLES-MEDINA et al., 2009). Vários processos industriais relevantes utilizam a reação de transesterificação para a produção de diferentes compostos. Na transesterificação de óleos vegetais, moléculas de triacilglicerol e álcool são transformados em alquil ésteres de ácidos graxos. Todo o processo é uma sequência de três reações consecutivas reversíveis, com a formação de mono e diglicerídeos como produtos intermediários (figura 7) (BAJAJ et al., 2010; SCHUCHARDT et al., 1998).

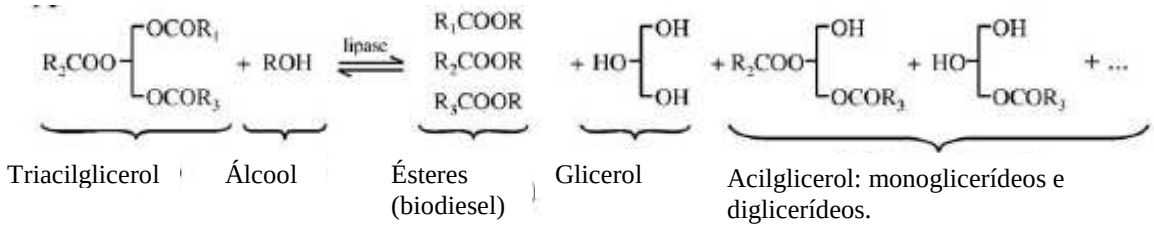


Figura 7. Representação da reação de transesterificação de uma molécula de triacilglicerol e três moléculas de álcool, na presença de um catalisador enzimático formando ésteres de ácidos graxos, glicerol, mono e diglicerídeos (ROBLES-MEDINA et al., 2009).

Os ésteres de ácidos graxos, produtos de reações de transesterificação, são utilizados como matéria-prima em vários tipos de indústrias, na produção de surfactantes não-iônicos, emulsificantes, agentes plastificantes e lubrificantes, aditivos farmacêuticos e cosméticos, óleos comestíveis não-calóricos, aditivos de alimentos ou ainda, podem ser utilizados como uma fonte alternativa de combustível, o biodiesel (SCHUCHARDT et al., 1998).

O biodiesel (alquil ésteres) possui propriedades físico-química e potencial energético semelhante aos do petrodiesel. Pode ser usado em veículos na forma pura ou misturado ao diesel convencional, sem modificações no motor, visto que o biodiesel possui melhores propriedades lubrificantes, que melhora o rendimento do motor e o tempo de vida do mesmo. No Brasil, o biodiesel é usado misturado ao diesel, em 2010, começou-se a usar o B5, ou seja,

5% de biodiesel é adicionado ao diesel vendido nos postos de combustível de acordo com a Resolução ANP Nº 7, de 19/03/2008 (DOU 20.3.2008). A produção mundial de biodiesel foi de aproximadamente 8,5 bilhões de tonelada em 2007, e a ANP estima a produção anual de biodiesel no Brasil seja de aproximadamente 176 milhões de litros (http://www.biodieselbr.com/biodiesel/brasil/biodiesel-brasil.htm).

A conversão de óleos e álcoois em ésteres podem ser realizadas por diferentes catalisadores ou em condições supercríticas. Os catalisadores utilizados podem ser classificados como: químico alcalino (hidróxido de sódio, hidróxido de potássio e metóxido de sódio), químico ácido (ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido clorídrico e ácido sulfônico), enzimático (lipases) e inorgânicos heterogêneos.

Praticamente 100% da produção mundial de biodiesel é feita por catalisador químico alcalino. No entanto, pequenas quantidades de ácidos graxos livres ou a presença de água pode levar à formação de sabão causando redução do rendimento. Também existe a necessidade de se tratar os efluentes gerados, pois existe um alto consumo de água nos passos de purificação desse processo. O subproduto formado, o glicerol, apresenta uma alta viscosidade e normalmente se apresenta contaminado com a base, havendo a necessidade de purificação, esses fatores dificultam o processo especialmente no que se refere aos custos. A vantagem desse processo é o baixo custo e o alto rendimento na conversão. Na catálise química por ácidos não ocorre a formação de sabões, mas uma alta temperatura e uma alta razão molar é requerida. Os catalisadores ácidos raramente são usados em escala industrial por serem mais corrosivos, e apresentam baixo rendimento em relação à catálise básica (SHARMA et al., 2008; ROBLES-MEDINA et al., 2009).

No entanto, tem se estudado a utilização de enzimas como biocatalisadores. Com a utilização de lipases como catalisadoras no processo, vários problemas são eliminados, como a temperatura de reação que é mais branda (30-40ºC, representando economia de energia), a conversão dos ésteres é completa, a recuperação do glicerol é simples, não é necessária a purificação de ésteres, é possível a utilização de compostos não-tóxicos, o processo apresenta alta especificidade influenciando da composição do alquil éster produzido, a presença de determinadas quantidades de água é permitida, podem atuar em óleos de diferentes origens inclusive o residual contendo alta taxa de acidez. Além de serem biodegradáveis e não-tóxicos diferentes de alguns catalisadores químicos. Quando se utiliza lipase imobilizada, o biocatalisador pode ser facilmente separado e pode adicionar maior estabilidade à enzima. A lipase pode ser transformada geneticamente alcançando melhor eficiência. Recentemente, lípases termoestáveis e tolerantes à álcool de cadeia curta foram clonadas e utilizadas na

síntese de biodiesel (YANG et al., 2009). Esse processo, no entanto, apresenta algumas desvantagens, como menor rendimento quando comparado com o processo sintetizado por catalisador alcalino e também um alto custo em função do preço da enzima (FUKUDA et al., 2001; HARDING et al., 2007;WANG et al., 2006).

A possibilidade de se utilizar enzimas com atividade em elevadas temperaturas, pode aperfeiçoar o processo devido à maior reatividade (maior velocidade de reação, menor restrição de difusão, maior solubilidade do substrato e produtos favorecendo o deslocamento do equilíbrio em reações endotérmicas), ao aumento da solubilidade dos lipídeos e de outros substratos hidrofóbicos em água, a diminuição da viscosidade do substrato, ao aumento da solubilidade dos reagentes, à redução do risco de contaminação por micro-organismos mesofílicos que são a maioria no ambiente. As lipases termoestáveis podem ser também tolerantes a solventes e detergentes. Essa propriedade está relacionada com a estrutura da enzima e é influenciada por fatores como pH do meio e presença de íons metálicos (TREVISAN, 2004).

Existem vários fatores que também são considerados importantes e afetam o rendimento das reações como, temperatura, presença de água, agitação, índice de acidez e de peróxido (BAJAJ et al., 2010). Watanabe e colaboradores (2002) observaram que o conteúdo de fosfolipídios presente nos óleos pode influenciar negativamente na produção do biodiesel por lipases. Quando esse conteúdo era superior a 1%, a síntese na presença de lipase de *Candida antarctica* era completamente inibida.

Óleos vegetais (soja, milho, algodão, palma etc) são considerados excelentes fontes de energia renovável e potencialmente inesgotável. São comumente compostos por moléculas de triacilglicerol, sendo bons substratos em reações de transesterificação para a produção do biodiesel (ésteres derivados de ácidos graxos) (FANGRUI et al., 1999; MEHER et al., 2006; SCHUCHARDT et al., 1998). Vários tipos de óleos e gorduras podem ser usados na síntese enzimática de biodiesel, tornando a lipase um catalisador competitivo em relação aos químicos. O uso de óleo residual ou de fritura é um fator relevante na reciclagem desses óleos, que podem ser catalisados por lípases.

Vários tipos de álcoois também (C1 a C4) podem ser usados nessas reações: metanol, etanol, propanol, isopropanol, 2-propanol, n-butanol e isobutanol. O metanol e o etanol são os mais baratos e produzidos em maior escala, por isso são os mais utilizados. A taxa de catálise enzimática da transesterificação normalmente aumenta com o tamanho da cadeia de hidrocarboneto dos álcoois. Entretanto, o excesso de álcool pode causar inativação da enzima, esse é um dos maiores obstáculos na produção enzimática do biodiesel. A velocidade do

rendimento da reação por catálise enzimática está relacionada com a taxa de desnaturação enzimática. Para resolver esse problema, três soluções têm sido testadas: adição do álcool em várias alíquotas para evitar que ocorra desnaturação da enzima, utilização de solventes e alterações acil-aceptor. A adição de álcool em alíquotas é a opção mais utilizada. Metil acetato ou etil acetato são os mais utilizados como acil-aceptor, esse método não é muito vantajoso pelo alto custo. Algumas vezes, a reação pode ser realizada em sistema com solvente orgânico, o que melhora a solubilidade do álcool no óleo, sendo terc-butanol um dos solventes mais utilizados. (ANTCZAK et al., 2009; TAN et. al., 2010).

A adição de álcool à reação é dependente da resistência da enzima ao álcool e ao conteúdo de água presente. A velocidade de desnaturação da enzima pelo metanol pode aumentar com a adição de água à reação, no entanto, em sistemas contendo etanol, propanol, isopropanol, butanol e isobutanol a presença de pequenas quantidades de água se faz necessária. A estrutura e a concentração do álcool afetam a estabilidade enzimática, sendo esse o fator ao qual se baseia a escolha de sistemas livres ou não de solvente, já que usualmente os solventes orgânicos protegem a enzima de desnaturação pelo álcool (ANTCZAK et al., 2009; SHIMADA et al, 2002).

Algumas peculiaridades são importantes para o sucesso das reações, como utilizar um excesso molar de álcool sobre o óleo, o que aumenta o rendimento da reação. Entretanto, também pode inativar a enzima, particularmente quando o álcool é insolúvel na mistura, podendo formar emulsão, dependendo da intensidade de agitação. A adição de solvente orgânico à mistura aumenta a solubilidade do álcool, protegendo a enzima de inativação ou pode ser adicionado em porções mantendo a concentração de álcool baixo, já que um grande rendimento na produção de biodiesel apresenta como pré-requisito o excesso molar de álcool (ANTCZAK et al., 2009). Para a razão molar de metanol:óleo de girassol em 3:1 (em hexano) a taxa de conversão chegou a 72% em 24h, utilizando-se a enzima imobilizada de *Pseudomonas fluorescens*. Já usando-se uma razão molar 4,5:1 houve inativação da enzima (SOUMANOU, BORNSCHEUER, 2003). Em um estudo que se variou a razão molar de 1:1 a 6:1, e a maior taxa de conversão observada foi em 6:1 (FUKUDA et al., 2001).

A temperatura ótima para a atividade de lipase observada na transesterificação variou entre 30º e 55ºC (ISO et al.,2001). A água tem uma forte influencia na atividade e na estabilidade da lipase. Estudos revelam que a adição de pequenas alíquotas à catálise enzimática leva a um aumento da taxa de conversão na síntese de ésteres, pois pequenas quantidades de água são necessárias para manterem a enzima ativa, mas uma quantidade maior que o necessário pode influenciar no equilíbrio químico deslocando a reação para a

hidrólise (ANTCZAK et al., 2009; TAN et al., 2010). Shah e Gupta (2007) avaliaram a adição de 1-10% de água na etanólise utilizando-se a lipase de *P. cepacia*, e observaram um rendimento de 98% com adição de 5% de água e apenas 70% quando a água não foi adicionada à reação. A figura 8 mostra a relação entre à adição de água e o equilíbrio entre as reações de hidrólise e transesterificação (ANTCZAK et al., 2009).

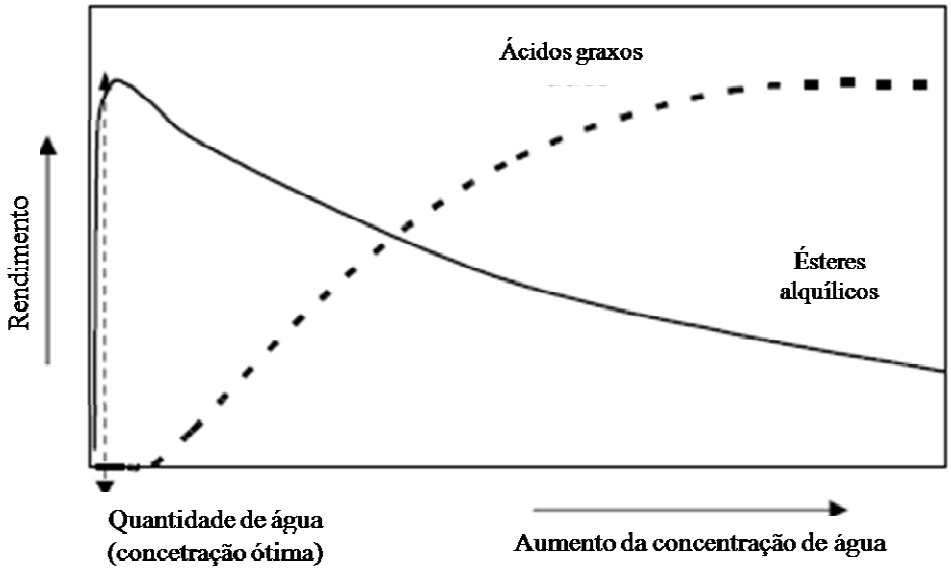


Figura 8. Efeito da concentração da água na conversão de produtos de transesterificação enzimática (alquil ésteres) e na hidrólise (ácidos graxos). A concentração ótima depende da enzima e da composição do meio reacional (ANTCZAK et al., 2009).

Grupos polares de resíduos de aminoácidos das enzimas podem estar positiva ou negativamente carregados dependendo do pH em seu micro-ambiente e podem afetar as reações em soluções não aquosas, a esse efeito denomina-se “memória de pH”. O ajuste do pH no micro-ambiente enzimático se faz necessário, contribuindo para um aumento da atividade catalítica, geralmente esse ajuste é feito na preparação da lipase (ADAMCZAK, BEDNARSKI, 2004; ANTCZAK et al., 2009).

Estudos indicam que o glicerol também causa efeito na síntese do biodiesel, pois o aumento da concentração do glicerol, conforme é produzido causa inibição da proteína. Alguns autores observaram o efeito do glicerol em lípases imobilizadas em matrizes hidrofílicas. A molécula de glicerol é adsorvida ao suporte formando um revestimento, impedindo o acesso da enzima ao substrato hidrofóbico. A adição de outras substâncias hidrofílicas pode solucionar o problema, removendo o glicerol. Em algumas preparações de lipase pode-se ser utilizar o terc-butanol, utilizado como solvente orgânico nas reações de

transesterificação, protegendo as enzimas desse efeito (DOSSAT et al., 1999; DU et al., 2003).

O estudo das condições da reação de transesterificação é fundamental para uma alta eficiência catalítica, e produção de enzimas por micro-organismo aliados à imobilização tem o intuito de diminuir os custos do biocatalisador, tornando-o competitivo aos catalisadores químicos (BAJAJ et al., 2010).

Imobilização

A maior desvantagem da produção do biodiesel pelo processo enzimático é o custo, por isso lipases imobilizadas têm sido muito utilizadas em pesquisas recentes. A fácil recuperação e a reutilização são as principais vantagens de se usar biocatalisadores imobilizados. Maior estabilidade e rendimento têm sido observados (TAMALAMPUDI et al., 2008).

Enzimas imobilizadas são definidas como enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em um suporte com retenção da sua atividade catalítica e podem ser usadas repetidamente e continuamente. Vários métodos podem ser utilizados na imobilização de enzimas, como adsorção, ligação covalente, encapsulação ou ligação-cruzada (JEGANNATHAN et al., 2008; TAN et al., 2010).

A adsorção é a técnica mais utilizada na imobilização de enzimas para utilização na produção do biodiesel. A enzima se liga à superfície de um carreador por forças fracas, como van der Walls e interações hidrofóbicas, são facilmente recuperadas e apresentam baixo custo (JEGANNATHAN et al., 2008; TAN et al., 2010). Os principais suportes utilizados são: resina acrílica, membrana têxtil, polipropileno, celite e terra diatomácea (ROYON et al., 2007).

Vários autores estudaram a imobilização de lipases de diferentes fontes na produção do biodiesel: *Candida antartica* (DU et al., 2004; SHIMADA et al., 1999; WANG et al., 2007; WATANABE et al., 2000), *Candida* sp. 99–125 (LU et al., 2007, 2008, 2009, 2010; LV et al., 2008; NIE et al., 2006; TAN et al., 2006), *Pseudomonas fluorescens* (ISO et al., 2001; SALIS et al., 2008; SOUMANOU, BORNSCHEUER, 2003), *Pseudomonas cepacia* (SALIS et al., 2005; SHAH, GUPTA, 2007), lipase de pâncreas suíno (YESILOGLU, 2004), *Rhizomucor Miehei* e *Chromobacterium viscosum* (SHAH et al., 2004; SHIEH et al., 2003; YESILOGLU, 2004).

A enzima pode se ligar também ao suporte por ligação covalente, a vantagem é que a ligação é irreversível, assim a enzima não é liberada em condições adversas (TREVAN,

1988a). Na encapsulação, uma matriz polimérica captura a lipase mantendo-a no seu interior, esse é um método rápido e barato. No entanto, só podem ser utilizadas quando o substrato apresentar baixa massa molar, substratos maiores não conseguem se difundir pelo poro do polímero (JEGANNATHAN et al., 2008; TAN et al., 2010).

O custo ainda é um obstáculo na utilização de biocatalisadores imobilizados, pois há a necessidade de processos caros de purificação para separar a enzima do meio de cultivo. Desse modo, a utilização da biomassa fúngica inteira ou confinada em esponjas de poliuretano vem sendo relatada na literatura como biocatalisador na produção do biodiesel (TAMALAMPUDI et al., 2008).

As células mantêm uma comunicação com o meio através da sua superfície, a membrana plasmática e as proteínas são cruciais nessa comunicação. Algumas proteínas atravessam a membrana, outras estão ligadas por interações não-covalentes com os componentes da membrana, outras proteínas específicas estão ancoradas na superfície celular participando da sinalização celular. Atualmente, a biotecnologia tem-se utilizado do mecanismo de transporte de proteínas da membrana plasmática em vários processos de bioconversão (FUKUDA et al., 2009).

A biomassa fúngica e as hifas confinadas em esponjas de poliuretano têm se mostrado mais eficientes com fungos filamentosos. Esta segunda técnica apresenta maior facilidade na reutilização e é fácil de executar já que as células podem se imobilizar espontaneamente durante o processo de fermentação nas esponjas (BAJAJ et al., 2010). A utilização de bucha vegetal pode representar um barateamento no custo do processo, tornando esse tipo de biocatalisador viável economicamente. E o fato de ser um produto natural representa a utilização de um produto biodegradável, não agredindo o meio ambiente.

Diante da importância do uso de enzimas como catalisadores, especialmente em reações de transesterificação, o presente trabalho tem como enfoque selecionar fungos termofílicos produtores de lipases com propriedade de transesterificação e um processo otimizado de produção de biodiesel, com baixos custos, alta eficiência e uma grande capacidade de reutilização do catalisador.

REFERENCIAS

ABDEL-FATTAH, Y. Optimization of thermostable lipase production from a thermophilic *Geobacillus* sp. using Box–Behnken experimental design. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1217–1222, 2002.

ABEL, H. et al. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 26, p. 421–430, 2000.

ABRAMIC, M. et al. Purification and properties of extracellular lipases from *Streptomyces rimosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 522-529, 1999.

ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Enhanced activity of intracellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles, **Process Biochemistry**, v. 39, p.1347-1361, 2004.

ANDERSCH, P. et al. Ester Synthesis via Acyl Transfer (Transesterification). In: RUBIN, B.; DENNIS, E. A. (Org.). **Methods Enzimology,** 1997. Part B, v. 286, p. 406-442.

ANDO, S. et al. Hyperthermostable endoglucanase from *Pyrococcus horikoshi*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 430–433, 2002.

ALONSO, F. O. M. Efeito da agitação e aeração na produção de lípases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682). Rio de Janeiro, 2001. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

ANTCZAK, M. S. et al. Enzymatic biodiesel synthesis: Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy,** v. 34, p. 11-85-1194, 2009.

BAJAJ, A. et al. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 9-14, 2010.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A0. L.; MALCATA F. X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 392-416, 1996.

BANCERZ, R.; GINALSKA, G., A novel thermostable lipase from Basidiomycete *Bjerkandera adusta* R59: characterisation and esterification studies. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,** v. 34, p. 553-560, 2007.

BHARDWAJ, K; RAJU, A.; RAJASEKHARAN, R. Identification, purification, and characterization of a thermally stable lípase from rice bran. A new member of the (Phospho) lipase family. **Plant Physiology**, v. 127, p. 1728-1738, Dec. 2001.

BIODIESEL BR. Disponível em: http://www.biodieselbr.com/biodiesel/brasil/biodiesel-brasil.html. Data: 25/10/2010.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p.73-81, 2002.

BROCCA S et al. Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isozymes. **Protein Science**, v. 12, p. 2312-2319, 2003.

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

CASTRO-OCHOA, L .D. et al. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR 11. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 648-654, 2005.

CHAPUS C., SÉMÉRIVA M. Mechanism of pancreatic lipase action. 2. Catalytic properties of modified lipases. **Biochemistry**, v. 15, n. 23, p. 4988–4991, 1976.

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

CRUZ**,** P. M.; CHRISTEN, P.; FARRES, A. Medium optimization by a fractional factorial design for lipase production by *Rhizopus delemar*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 76, n. 2, p. 94-97, 1993.

CYGLER M. et al. A Structural Basis for the Chiral Preferences of Lipases. **Journal of the American Chemical Society,** v.116, p. 3180-3186, 1994.

DONG-WOO, L. Isolation and characterisation of thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. FEMS **Microbiological Letters**, v. 179, p. 393–400, 1999.

DOSSAT, V. et al. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bad reactor: influence of the glycerol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 3-5, p. 194-200, 1999.

DU, W. et al. Improving lipase-catalyzed enantioselective amnonolysis of phenylglicine methyl ester in organic solvent *in situ* racemization. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 6, p. 461-464, 2003.

DU, W. et al. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 125–129, 2004.

ESPINOSA, E.; SANCHEZ, S.; FARRES, A. Nutritional factors affecting lipase production by *Rhizopus delemar* CDBB H313. **Biotecnhology Letters**, v. 12, n.3, p. 209-214, 2005.

ERICSSON D. J. et al. X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, p. 109-119, 2008.

FANGRUI, M.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 1-15, 1999.

FERRER , M. et al Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum*

isolated from industrial wastes. **Journal of Chemical Tecnhology and Biotecnhology**, v. 75, n. 7, p. 569-576, 2000.

FUKUDA, H. et al. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001.

FUKUDA H. et al. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 2-12, 2009.

FORESTI, M.L. et al. Kinetic modeling of enzymatic ethyl oleate synthesis carried out in biphasic systems. **Applied Catalysis A: General**, v.334, p. 65-72, 2008.

GOMES, E. et al. Enzimas termestáveis: fonte, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v.30, p.136-145, 2007.

GUPTA, R. et al. Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 135–138, 1999.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important termostable enzymes: a review. **Bioresource technology**, v. 89, p. 17-34, 2003.

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry and Biology**, v. 5, p. 245–249, 1994.

HARDING, K.G. et al. A life-cycle comparison between inorganic and biological catalysis for the production of biodiesel. **Journal of Cleaner Production**, v. 16, p. 1368-1378, 2007.

HASAN, F. et al. Industrial Applications of Microbial Lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p.235-251, 2006.

HASAN, F. et al. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 782-798, 2009.

HASAN, F. et al. Enzymes used in detergents: Lipases. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 31, p. 4836-4844, 2010.

HIOL, A. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. **Enzyme and Microbial Tecnology**, v. 25, 80-87, 1999.

HIOL, A. et al. Purification and characterization of an extracelullar lipase from a thermophylic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 421-430, 2000.

HOQ M.M. et al. Continuous hydrolysis of olive oil by lipase in microporous hydrophobic membrane bioreactor. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 62, p. 1016-1021, 1985.

HOTTA, Y. et al. Extremely stable and versatile carboxyl esterase from a hyperthermophilic archaeon. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3925–3931, 2002.

IIZUMI, T. et al. T. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, p. 1253–1258, 1990.

IMAMURA, S, KITAURA, S. Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H-257. **Journal of Biochemistry**, v. 127, p. 419–425, 2000.

ISO, M. et al. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.16, p. 53–58. 2001.

IVANOVA**,** M. et al. I. Action of *Humicola lanuginosa* lipase on long-chain lipid substrates 1. Hydrolysis of monoolein monolayers. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 26, n. 4, p. 301-314, 2002.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnol**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JAEGER K.E., EGGERT T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390-397, 2002.

JEGANNATHAN K.R. et al. Production of biodiesel using immobilized lipase — a critical review. Critical Reviews and Biotechnology, v. 28, p. 253–64. 2008.

JOSEPH, B. et al. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 26, p.457-470, 2008.

KADEMI A. et al. Lipases. In: _____. Editores: PANDEY, A., WEBB, C., SOCCOL, C.R., LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. India: Asiatech Publishers; 2005. p. 297–318.

KHARE S. K. et al. Lipase catalyzed interesterification reaction and their industrial applications. **Industries Journal**, v.19, p. 29–35, 2000.

KAKUSHO Y et al. Production and properties of alkaline lipase from *Alcaligenes* sp. strain No. 679. **Agriccultural and Biological Chemistry**, v. 46, p. 1743–1750, 1998.

KIM, Y. D., KIM, S. C. Effect of chemical structure on the biodegradation of polyerathanes under composting conditions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 62, p. 343-352, 1998.

KLIBANOV, A. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. **Science**, v. 219, p. 722–727, 1983.

KULKURANI, N., GADRE, R. A novel alkaline, thermostable, protease free lipase from *Pseudomonas* sp. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 897–899, 1999.

KUMAR, C.G. et al. Novel enzyme-based detergents: An Indian perspective. **Current Science**, v. 75, p. 1312-1318, 1998.

LU J. et al. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99–125. **Process Biochemistry**, v. 42, p.1367–1370, 2007.

LU, J. et al. Immobilized lipase Candida sp. 99–125 catalyzed methanolysis of glycerol trioleate: Solvent effect. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6070–6074, 2008.

LU, J. et al. Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida* sp. 99–125 in organic solvent system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 122–125, 2009.

LU, J. et al. Pretreatment of immobilized *Candida* sp. 99–125 lipase to improve its methanol tolerance for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 62, p. 15–18, 2010.

LV, P. et al. Conversion of soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida* lipase on textile cloth. **Energy Source Part A**, v. 30, 872–879, 2008.

MARTINS, T. S. Produção e purificação de lípases de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. Rio de Janeiro, 2001. Dissertação de mestrado. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MASSE, L. et al. The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 76, p. 629-635, 2001.

MATEOS-DIAZ, J. C. et al. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures, **Enzyme Microbiology Technology**, v. 39, p.1042-1050, 2006.

MEHER, L. C. et al. Optimization of alkali-catalyzed transesterification of *Pongomia pinnata* oil for production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1392-1397, 2006.

MORINAGA**,** T. et al. Lipase production of a new thermophilic fungus, *Humicola lanuginosa* var. *Catenulata*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 64, n. 5, p. 451-453, 1986.

MOZHAEV V. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. **Trends Biotechnology**, v. 11, p. 88–95, 1993.

NAGAO, T. et al C-Terminal Peptide of *Fusarium heterosporum* lipase is Necessary for its increasing thermostability. **The Journal of Biochemestry,** v. 124, n. 6, p. 1124-1129, 1998.

NAKASHIMA, T. et al. Culture conditions for intracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* and its immobilization within biomass support particles. **Journal of Fermentation Tecnhology**, v. 66, n. 4, 1988.

NAWANI, N. et al. A novel thermostable lipase from a thermophilic Bacillus sp.: characterization and esterification studies. **Biotecnology Letters**, v. 20, p. 997–1000, 1998.

NEUGNOT, V. et al. The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*: Molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes. **European Journal of**

Biochemistry, v. 269, p. 1734-1745, 2002.
NIE, K. et al. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: optimization of the biodiesel production. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p. 142–147. 2006.

NISHIO T et al. Purification and some properties of lipase produced by *Pseudomonas fragi* 22. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, p. 181-187, 1987.

NYBROE, O. et al. Enzyme activities in waste water and activated sludge. **Water Research**, v. 26, n. 5, p. 579-584, 1992.

OBRADORS, N. et al. Effects of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. **Biotecnhlogy Letters**, v. 15, n. 4, p. 357-360, 1993.

PANDEY, A. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 29, n. 2, p. 119-131, 1999.

PAQUES, F. W., MACEDO, G. A. Lipases de Látex vegetais: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PLEISS J et al. Anatomy of lipase binding sites: the sessile fatty acid binding site. **Chemistry and Physics of lipids**, v. 93, p. 67–80, 1998.

PRIM, N. et al. Use of methylumbeliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, p. 309-346, 2003.

RATHI, P. et al. A hyperthermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 495–498, 2000.

REIS P. et al. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147-18, p. 237-250, 2009.

ROBLES-MEDINA A. et al. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 398-408, 2009.

SALIS, A. et al. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 291–299, 2005.

SALIS, A. et al. Comparison among immobilized lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, p. 54, p.19–26, 2008

SAXENA, R. K. et al. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 239-247, 2003.

SCHUCHARDT, U. et al. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 1, p. 199-210, 1998.

SHARMA, R. et al. Production, purification, characterization, and applications of lipases**.** **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHARMA, R. et al. Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1075–1084, 2002.

SHARMA, R. et al. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Fuel**, v. 87, p. 2355-2373, 2008.

SHAH, S., GUPTA, M. N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 409–414, 2007.

SHAH, S. et al. Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of jatropha oil. **Energy Fuel**, v. 18, p. 154–159, 2004.

SHIEH, C.J. et al. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 103–116, 2003.

SHIMADA, Y. et al. Production of structured lipid containing docosahexaenoic and caprilic acids using immobilized *Rhizopus delemar* lipase. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, n. 4, p. 299-303, 1996.

SHIMADA, Y. et al. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 76, n. 7, p. 789-793, 1999.

SHIMADA, Y. et al. Enzymatic alcaholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, p. 133-142, 2002.

SINGHANIA, R.R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SOUMANOU, M.M., BORNSCHEUER, U.T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Enzyme Microbology Technology**, v. 33, p. 97-103, 2003.

SUGIHARA A et al. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. **Journal of Biochemistry**, v.109, p. 211–216, 1991.

SUGIHARA, A. et al. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. **Journal of Biochemistry,** v. 112, p. 598–603, 1992.

SUN, Y. S.; XU, Y. Solid state fermentation for "whole-cell synthetic lipase" production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 219-224, 2008.

STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 548-556, 2002.

TAMALAMPUDI, S. et al. Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipase as a biocatalyst. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p.185-189, 2008.

TAN, T. et al.Production of biodiesel by immobilized *Candida* sp. lipase at high water content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 128, p. 109–116, 2006.

TAN, T. et al. Biodiesel production with immobilized lipase: a review. **Biotechnology Advances**, *in press* 2010.

TREVAN M.D. Enzyme immobilization by covalent bonding. New Protein Techniques. Humana Press, p. 495–510, 1988a.

TREVISAN, H.C. Lipases. In: SAID, S; PIETRO, R. C. L. R., **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ed. Legis Summa, 2004. Cap.7, p. 115-135.

TRODLER, P. et al. Rational design of a new one-step purification strategy for *Candida antarctica* lipase B by ion-exchange chromatography. **Journal Chromatography A,** v. 1170, p. 161-167, 2008.

VILLENEUVE P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000.

VIELLE, C., ZEIKUS, G. J. Hypherthermophylic Enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 1, p. 1-43, 2001.

WANG, L. et al. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in tert-butanol system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzimatic**, 2006.

WANG, J-X. et al. Lipase-catalyzed production of biodiesel from high acid value waste oil using ultrasonic assistant. **Chinese Journal of Biotechnology**, v.23, p. 1121–1128, 2007.

WATANABE, N. et al. Studies on alkaline lipases from *Pseudomonas* species. Part I: Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of the crude enzymes. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, p. 1353–1358, 1977.

WATANABE, Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 77, p. 355–360, 2000.

WATANABE, Y. et al. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal Molecular Catalysis B: Enzimatic**, v. 17, p. 151-155, 2002.

YAN, F. et al. Thermophilicphospholi pase A2 in the cytosolic fraction from the archaeon *Pyrococcus horikoshii*. **JAOCS**, v. 77, p. 1075–1084, 2000.

YANG, K. S. et al. Catalytic properties of a lipase from Photobacterium lipolyticum for biodiesel production containing a high methanol concentration. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 6, p. 599-604, 2009.

YESILOGLU, Y. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil. **Journal of American of Oil Chemist's Society**, v. 81, p. 157–160, 2004.

CAPÍTULO II:
SELEÇÃO DE FUNGOS TERMOFÍLICOS PRODUTORES DE LIPASE EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

II.1 INTRODUÇÃO

As lipases alcançaram um lugar importante no mercado de enzimas, evidenciado pelo aumento do número de publicações na literatura que chega a 1000 por ano. Depois das proteases e amilases, as lipases são consideradas o terceiro grupo de enzimas de maior importância no mercado, provavelmente esse fato está relacionado com a atrativa versatilidade dessas enzimas para aplicações industriais (HASAN et al., 2006; RIGO et al., 2010).

As enzimas de origem microbiana são mais utilizadas do que as de origem animal e vegetal, por apresentarem um maior rendimento, fácil manipulação genética do organismo produtor, ausência de flutuações sazonais e rápido crescimento microbiano, com possibilidade de uso de meios de cultura de baixo custo. A utilização de lipases termoestáveis vem crescendo rapidamente, tanto as produzidas por alguns organismos mesofílicos, como aquelas provenientes de micro-organismos termofílicos devido a sua maior estabilidade em variadas condições como elevadas temperaturas, ampla faixa de pH e em presença de alguns usuais desnaturantes de proteinas (IMAMURA, KITAURA, 2000). Além dessas propriedades, os biocatalisadores termoestáveis são vantajosos, pois podem ser usados em temperatura de operação mais alta, reduzindo viscosidade das misturas de reação e problemas de contaminação (MOZHAEV, 2003; HASAN et al., 2006).

Lipases extracelulares são produzidas por uma ampla variedade de micro-organismos, sendo os fungos reconhecidamente as melhores fontes de produção dessa enzima. Essas enzimas são utilizadas nas aplicações industriais, em especial na indústria de alimentos (MAHADIK et al., 2002). Também são utilizadas em outros segmentos da indústria como na síntese de fármacos e detergentes, bioconversão de óleos e gorduras, indústria têxtil e de papel, e na síntese de biopolímeros (JOSEPH et al., 2008; VILLENEUVE et al., 2000).

As enzimas de fungos podem ser produzidas por Fermentação submersa (FSm), que é o processo mais usual na indústria de enzimas, e tem como vantagem um maior controle do processo (NAGY et al., 2006), sendo a produção de lipase influenciada pelo pH, temperatura, aeração e composição do meio neste processo (COSTAS et al., 2004).

Diante da grande demanda do uso de lipases na biotecnologia, a busca por novos micro-organismos produtores dessa enzima vem ganhando interesse, assim como, o estudo das condições de fermentação e o do processo a ser utilizado. Neste capítulo são mostrados os resultados de experimentos quer visaram selecionar fungos filamentosos termofílicos produtores de lipase, utilizando-se o processo fermentativo submerso.

II.2 OBJETIVOS

O objetivo dessa etapa do trabalho foi selecionar fungos termofílicos produtores de lipase e estudar a produção da enzima por fermentação submersa.

2.1 Objetivos específicos

- Seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de lipase: avaliação da produção da enzima em placa e fermentação submersa (FSm);
- Estudo da composição do meio e das condições de fermentação em FSm para cultivo de fungos selecionados como melhores produtores de enzima.

II.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção de Micro-organismos Termofílicos

A seleção de micro-organismos termofílicos produtores de lipase foi realizada por ensaios em placa de Petri e por fermentação submersa (FSm). As seguintes linhagens termofílicas foram testadas: *Chaetomium* sp N37, *Aspergillus fumigatus* N12, *Thermomyces lanuginosus* Rob., *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756, *Rhizomucor pusillus*, *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, *Thermomyces lanuginosus* TO-03, *Themomyces lanuginosus* TO-05, *Themomyces lanuginosus* Rob., *Aspergillus fumigatus* T4.6.1, *Aspergillus fumigatus* T4.6.2 e *Aspergillus fumigatus* T5.1.2. Além dessas, foram testadas linhagens ainda não identificadas. Todas essas cepas foram isoladas em trabalhos prévios do grupo de Pesquisa em Enzimas microbianas e fazem parte da coleção de trabalho do laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da Unesp do Campus de São José do Rio Preto/SP.

3.2 Meios de cultura (Pré-Inóculo)

Para os cultivos das linhagens fúngicas foi utilizado meio nutriente modificado de Castro-Ochoa et al. (2005) contendo ($g.L^{-1}$): 1,0 peptona; 10,0 $(NH_4)_2SO_4$; 10,0 KH_2PO_4; 0,5 $MgSO_4.7H_2O$; 1,0 $CaCl_2$; 25 óleo de soja; 8,0 de emulsificante (Tween 80); 5 de solução de elementos traços (22,0 Zn $SO_4.7H_2O$; 11,0 de H_3BO_3; 5,0 $MnCl_2.4H_2O$; 5,0 $FeSO_4.7H_2O$; 1,6 $CoCl_2.5H_2O$; 1,6 de $CuSO_4.5H_2O$; 1,1 $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$; 50,0 de EDTA) e corrigindo-se o pH para 6,0. Para os meios sólidos acrescentou-se 30,0 $g.L^{-1}$ de ágar (a porcentagem maior de ágar que a usual de 20,0 $g.L^{-1}$ serve para diminuir a fluidez do meio a temperaturas altas).

3.3 Detecção da atividade lipolítica em placas de Petri

Os testes para avaliação da capacidade das cepas em secretar lipases foram realizadas utilizando-se três tipos de meio de cultura:

- Meio 1: 8,0 $mL.L^{-1}$ de meio nutriente (descrito no item 3.2), 0,01 $g.L^{-1}$ Rodamina B (Sigma-Aldrich), 4,0 $g.L^{-1}$ de NaCl, 10,0 $g.L^{-1}$ de agar e 30,0 $g.L^{-1}$ de óleo de soja (CASTRO-OCHOA et al., 2005).

- Meio 2: Segundo Fadiloglu et al. (1999) (com modificações):

Foram adicionados 8,0 $mL.L^{-1}$ de meio nutriente (1,0 $g.L^{-1}$ de peptona, 1,0 $g.L^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 $g.L^{-1}$ $MgSO_4.7H_2O$), 0,01 $g.L^{-1}$ Rodamina B, 4,0 $g.L^{-1}$ de NaCl, 10,0 $g.L^{-1}$ de agar e 30,0 $g.L^{-1}$ de óleo de soja.

- Meio 3: Segundo Fadiloglu et al. (1999) (com modificações):

Foram adicionados 8,0 $mL.L^{-1}$ de meio nutriente (7,0 $g.L^{-1}$ de peptona, 1,0 $g.L^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 $g.L^{-1}$ $MgSO_4.7H_2O$), 0,01 $g.L^{-1}$ Rodamina B (Sigma), 4,0 $g.L^{-1}$ de NaCl, 10,0 $g.L^{-1}$ de agar e 30,0 $g.L^{-1}$ de óleo de soja.

- Meio 4: Segundo Fadiloglu et al. (1999) (com modificações):

Foram adicionados 8,0 $mL.L^{-1}$ de meio nutriente (7,0 $g.L^{-1}$ de peptona, 1,0 $g.L^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 $g.L^{-1}$ $MgSO_4.7H_2O$, 5 $mL.L^{-1}$ de elementos traços descrito em 3.2; 10 $g.L^{-1}$ de Tween 20), 0,01 $g.L^{-1}$ Rodamina B (Sigma), 4,0 $g.L^{-1}$ de NaCl, 10,0 $g.L^{-1}$ de agar e 30,0 $g.L^{-1}$ de óleo de soja.

- Meio 5: Meio nutriente adaptado por Jensen et al (2002) e Sandhya et al. (2005): Foram adicionados 8,0 $mL.L^{-1}$ de meio nutriente (5,0 $g.L^{-1}$ de glicerol, 3,0 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura, 1,0 $g.L^{-1}$ Na_2CO_3, 1 $g.L^{-1}$ K_2SO_4, 0,2 $g.L^{-1}$ de $MgCl_2$, 3 $g.L^{-1}$ de $(NH_4)_2HPO_4$, 5 $mL.L^{-1}$ de elementos traços descrito em 3.2 e corrigindo-se o pH para 8,5), 0,01 $g.L^{-1}$ Rodamina B (Sigma), 4,0 $g.L^{-1}$ de NaCl, 5,0 $g.L^{-1}$ de agar e 20,0 $g.L^{-1}$ de óleo de soja.

A área da placa contendo o meio foi dividida em 2 a 6 partes, e em cada uma foi inoculado, por meio de picada, uma linhagem diferente. A incubação foi a 45º C e as leituras feitas em períodos de 24 a 72 h. A atividade de lipase extracelular foi identificada por um halo fluorescente em torno das colônias visualizado por luz UV a 350 nm (CASTRO-OCHOA et al., 2005).

3.4 Fermentação Submersa (FSm)

Foram feitos alguns testes para seleção do meio de cultura a ser utilizado na FSm. O

meio nutriente utilizado foi o descrito no item 3.2, no qual variou-se alguns componentes ($g.L^{-1}$): 20,0 e 8,0 de Tween 80, 0 e 1,0 de glicose, 25 óleo de soja ou óleo de fritura usado.

Na primeira etapa do projeto foi realizada uma investigação da produção de lipases ácidas extracelulares em fermentação submersa pelas linhagens selecionadas pelos ensaios feitos seguindo o item 3.3. O processo de fermentação foi realizado em erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio nutriente estéril descrito (3.2) acrescentado de 25,0 $g.L^{-1}$ de óleo de soja, 8,0 $g.L^{-1}$ de Tween 80 (emulsificante) e 1,0 $g.L^{-1}$ de glicose (somente para *T. indicae-seudaticae* N31). Esse meio foi inoculado com 4 mL de suspensão de micélio, incubado a 45º C sob agitação de 100 rpm por até 360 h. A cada período de 24 h de fermentação, o material de um erlenmeyer foi filtrado a vácuo utilizando-se papel de filtro Whatman nº 1 e centrifugado. O sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta. A massa micelial foi mantida a 60°C até massa seca constante, para avaliação do crescimento microbiano.

3.4.1 Efeitos das concentrações de glicose e óleo de soja dos meios na produção de lipase por FSm

A fermentação foi realizada como descrito em 3.4, variando-se a concentração de óleo de soja (0 a 150 $g.L^{-1}$) e de glicose (1 a 10 $g.L^{-1}$).

3.4.2 Efeitos da temperatura e pH sobre a produção de lipase em FSm

Foram testadas temperaturas de 40 a 50 ºC e valores de pH inicial do meio de 5,0 a 7,5, utilizando-se o meio de cultura descrito em 3.4.

3.5 Quantificação da atividade de lipase por hidrólise de sustrato cromogênico

Este método de hidrólise foi proposto por Winkler e Stukmann (1979), sendo modificado conforme Krieger (1995). O substrato sintético utilizado, o *p*-nitrofenil palmitato (*p*NPP), é hidrolisado pela enzima, em meio aquoso contendo como emulsificantes a goma arábica e o Triton X-100. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1 μmol de *p*NP (*p*nitrofenol) por min nas condições da reação. O coeficiente de extinção molar do *p*NP utilizado foi $8{,}03.10^{-3} M.L^{-1}$ (LIMA et al., 2004).

Soluções Utilizadas:

- Solução A: *p*-nitrofenil palmitato em isopropanol, em uma concentração de 3 mg/mL.

- Solução B: 2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica, em 450 mL tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0.

A 9 mL da solução B foi misturado 1 mL da solução A, lentamente e sob contínua agitação, para o preparo da solução de substrato. Foi utilizado 0,9 mL da solução pronta e adicionado 0,1 mL do extrato enzimático. A reação foi incubada a uma temperatura de 45 °C por 1 minuto, e a absorção foi lida em espectrofotômetro a 410 nm.

3.6 Proteína Total

A determinação da concentração de proteínas totais da solução enzimática bruta e da solução fracionada foi feita através do método de Bradford (1976), usando soroalbumina bovina como padrão.

3.7 Precipitação

A solução enzimática bruta foi fracionada com álcool ou acetona gelado a concentrações de 50, 67, 75 e 80% e deixado por 24h. O precipitado foi separado por centrifugação (10.000 g por 20 min a 6ºC) e ressuspenso em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0. Os testes de atividade de lipase do sobrenadante e do precipitado foram realizados conforme o descrito no item 3.5 e quantificação de proteína total conforme descrito no item 3.6. O rendimento foi calculado dividindo-se o valor de atividade total do material fracionado pela atividade total da enzima bruta (inicial) e multiplicado por 100. O fator de purificação foi obtido pela divisão da atividade específica do material fracionado pela atividade específica da enzima bruta.

3.8 Eletroforese

Zimograma SDS-PAGE foi realizado de acordo com Fuciños et al. (2005) utilizando um gel de poliacrilamida a 15% com 0,1% de SDS (dodecil sulfato de sódio). A detecção de lipases foi feita com uma solução corante contendo α- e β-naftil acetato na presença de fast blue. Um kit (SIGMA) padrão de baixa massa molar de proteínas foi utilizado: Fosforilase b (97 kDa), Albumina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anidrase Carbônica (30 kDa), Inibidor de Tripsina (20 kDa), α–lactoalbumina (14.4 kDa). Para detecção de outras proteínas foi utilizada solução corante de prata.

II.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Detecção da atividade lipolítica em placas de Petri

Dos 45 fungos testados (tabela 1), 40 apresentaram crescimento em meio sólido contendo óleo como única fonte de carbono (descrito no item 3.2). Essas linhagens foram submetidas à detecção da atividade lipolítica em placas de Petri, utilizando o corante fluorescente Rodamina B, variando-se os meios conforme descrito em 3.3. A lipase libera os ácidos graxos hidrolisados do triacilglicerol, que se complexam com a Rodamina B produzindo uma coloração laranja fluorescente observada sob luz UV (KOUGKER, JAEGER, 1987; MESSIAS et al, 2009). Dessa maneira, foi feita uma pré-seleção dos fungos a serem submetidos à fermentação.

Entre os fungos analisados neste ensaio, 20 produziram halos de hidrólide, sendo que duas linhagens apresentaram resultados expressivos (tabela 1, figura 1A-3A apêndice) *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e *Rhizomucor pusillus* nos meios 2 e 3, mostrando halos de 3 cm de diâmetro. *A. fumigatus* N12 e *T. lanuginosus* Rob apresentaram um halo menor que 1 cm em meio 3, o mesmo foi observado para *Aspergillus* sp T1.1.1 em meio 5.

Os fungos T2.2, T2.1.2, *Humicola* sp T2.3 produziram um halo em torno de 2 cm em meio 5, *Thermomyces* sp T1.1.1, T 4.7.1 e T 4.4.2 um halo de cerca de 1,5 cm, *Aspergillus* sp T1.1.2 e T5.3 apresentaram halos menores com diâmetro em torno de 1 cm neste mesmo meio. Outros fungos não cresceram ou apresentaram halos menores que 0,5 cm de diâmetro.

Tabela 1. Relação de fungos testados na detecção da atividade lipolítica em placa e os respectivos diâmetros dos halos de reação de ácidos graxos e rodamina.

Fungos	**Cultivo em placa com meio sólido contendo óleo como única fonte de carbono.**	**Detecção de lipase em meio contendo Rodamina B (diâmetro do halo em cm).**		
	Meio 1	**Meio 2**	**Meio 3**	**Meio 5**
Chaetomium sp N37	--	--	--	--
Thermomucor indicae-seudaticae N31	X	3,0	3,0	--
Rhizomucor pusillus	X	3,0	3,0	--
Thermoascus aurantiacus	--	--	--	--
Thermomyces lanuginosus Rob	X	--	<1,0	--
Thermomyces lanuginosus TO-03	--	--	--	--
Aspergillus fumigatus N12	X	--	<1,0	--

T1.2	X	--	--	--
T1.3	X	--	--	--
Aspergillus sp T1.1.1	X	--	--	1,5
Aspergillus sp T1.1.2	X	--	--	<1,0
T2.1.1	X	--	--	
T2.2	X	--	--	2,0
T2.1.2	X	--	--	2,0
Humicola sp T2.3	X	--	--	2,0
T2.1	--	--	--	--
T2.2.2	X	--	--	--
T3.1.1	X	--	--	<0,5
T3.1.2	X	--	--	<0,5
T3.2	X	--	--	--
T3.2.2	X	--	--	<0,5
Aspergillus sp T3.3.1	X	--	--	<0,5
T4.1	X	--	--	--
T4.1.2	X	--	--	--
T4.2.1	X	--	--	--
T4.2.2	X	--	--	--
T4.3.1	X	--	--	--
T4.3.2	X	--	--	--
T4.4.1	X	--	--	--
T4.5	X	--	--	--
T4.5.1	X	--	--	--
Aspergillus fumigatus T4.6.1	X	--	--	0,5
Aspergillus fumigatus T4.6.2	X	--	--	0,5
Thermomyces sp T4.7.1	X	--	--	1,5
T4.7.2	X	--	--	--
Thermomyces sp T4.2.1	X	--	--	--
Thermomyces sp T4.4.2	X	--	--	1,5
T4.7.2	X	--	--	--
T5.2	X	--	--	--
T5.3	X	--	--	<1,0
T5.4.2	X	--	--	--
Aspergillus fumigatus T5.1.2	X	--	--	0,5
Aspergillus sp T5.1.1	X	--	--	<0,5
T6.1	X	--	--	--
T6.2	X	--	--	--

Meio 1: Meio nutriente modificado de Castro-Ochoa et al. (2005) contendo ($g.L^{-1}$): 1,0 peptona; 10,0 $(NH_4)_2SO_4$; 10,0 KH_2PO_4; 0,5 $MgSO_4.7H_2O$; 1,0 $CaCl_2$; 25 óleo de soja; 8,0 de emulsificante (Tween 80); 5,0 de

solução de elementos traços traço (22,0 Zn $SO_4.7H_2O$; 11,0 de H_3BO_3; 5,0 $MnCl_2.4H_2O$; 5,0 $FeSO_4.7H_2O$; 1,6 $CoCl_2.5H_2O$; 1,6 de $CuSO_4.5H_2O$; 1,1 $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$; 50,0 de EDTA), 30,0 de agar e pH 6,0.

Meio 2: Segundo Fadiloglu et al. (1999) (com modificações): 8,0 $mL.L^{-1}$ de meio nutriente (1,0 $g.L^{-1}$ de peptona, 1,0 $g.L^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 $g.L^{-1}$ $MgSO_4.7H_2O$), 0,01 $g.L^{-1}$ Rodamina B (Sigma), 4,0 $g.L^{-1}$ de NaCl, 10,0 $g.L^{-1}$ de agar e 30,0 $g.L^{-1}$ de óleo de soja;

Meio 3: 8,0 $mL.L^{-1}$ de meio nutriente (7,0 $g.L^{-1}$ de peptona, 1,0 $g.L^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 $g.L^{-1}$ $MgSO_4.7H_2O$), 0,01 $g.L^{-1}$ Rodamina B (Sigma), 4,0 $g.L^{-1}$ de NaCl, 10,0 $g.L^{-1}$ de agar e 30,0 $g.L^{-1}$ de óleo de soja;

Meio 5: Meio nutriente adaptado por Jensen et al (2002) e Sandhya et al. (2005): 8,0 $mL.L^{-1}$ de meio nutriente (5,0 $g.L^{-1}$ de glicerol, 3,0 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura, 1,0 $g.L^{-1}$ Na_2CO_3, 1 $g.L^{-1}$ K_2SO_4, 0,2 $g.L^{-1}$ de $MgCl_2$, 3 $g.L^{-1}$ de $(NH_4)_2HPO_4$, 5 $mL.L^{-1}$ de elementos traços, pH 8,5), 0,01 $g.L^{-1}$ Rodamina B (Sigma), 4,0 $g.L^{-1}$ de NaCl, 5,0 $g.L^{-1}$ de agar e 20,0 $g.L^{-1}$ de óleo de soja.

-- Não houve crescimento. Em meio 4 não houve produção de halos (descrito em 3.3).

Halos referentes a atividade de lipase entre 6-7 cm foram encontrados em diferentes espécies do genêro *Rhizomucor* por Alves et al. (2002). Corroborando os resultados aqui apresentados ao potencial do gênero *Rhizomucor* para produção de lípases.

Segundo Sandoval e Marty (2007), a rodamina B é um indicador sensível que detecta atividade de lipase apartir de 60mU. Outros indicadores (tributirina, Tween 80 etc) são usados por outros autores (CIHANGIR, SARIKAYA, 2004; COSTAS et al., 2004; JANDA, 2005) para detecção em placa de enzimas lipolíticas, mas não são adequados, pois não detectam somente as lipases verdadeiras, sendo esses indicadores hidrolisados por esterases também (KOUKER, JAEGER, 1987).

De acordo com o que foi apresentado, esse ensaio se mostrou eficiente para uma pré-seleção das linhagens a serem fermentadas.

4.2 Produção de lipases em Fermentação Submersa (FSm)

As cepas utilizadas foram previamente cultivadas em pré-inóculo com meio sólido contendo óleo de soja, visto que, Quadros e colaboradores (2007) observaram que a produção de lipase está diretamente relacionada com a presença de agentes indutores no pré-inóculo que antecede a fermentação. O meio 1 descrito em 3.3 contendo óleo foi adotado como pré-inóculo em todas as fermentações (FSm) considerando que os fungos *T. indicae-seudaticae* N31 e *R. Pusillus* apresentaram produção de lipases e a maioria dos fungos testados cresceram nesse meio em placa (tabela 1).

A fim de se aumentar a produção da lipase pelos fungos considerados produtores, alterações foram feitas no meio nutriente (tabela 2). O Tween 80 foi o emulsificante que levou à maior produção de lípase. Desse modo foi testada a variação da sua concentração (8,0 e 20,0 $g.L^{-1}$) em fermentação submersa.

Foram testadas também a ausência e a presença de glicose e o óleo de soja foi

substituído pelo óleo de fritura usado (figura 4A-5A apêndice).

Tabela 2. Efeito da variação da glicose e da concentração de Tween 80 na produção de lipase em FSm pelas linhagens testadas.

Composição dos meios avaliados	*Thermomucor indicae-seudaticae* N31		*Rhizomucor pusillus*	
	Atividade (U/mL)	Tempo de cultivo (h)	Atividade (U/mL)	Tempo de cultivo (h)
1) Meio 1 ($g.L^{-1}$) adicionado de 1,0 de glicose; 25 óleo de soja e 8,0 de Tween 80.	2,83	192	0,19	168
2) Meio 1 ($g.L^{-1}$) adicionado de 25 óleo de fritura; 1,0 de glicose e 8,0 de Tween 80.	0,76	192	--	--
3) Meio 1 ($g.L^{-1}$) adicionado de 25 óleo de fritura; 1,0 de glicose e 20,0 de Tween 80.	0,59	96	--	--
4) Meio 1 ($g.L^{-1}$) adicionado de 25 óleo de soja; 1,0 de glicose e 20,0 de Tween 80.	2,34 1,48	96 168	0,74	96
5) Meio 1 ($g.L^{-1}$) adicionado de 25 óleo de soja; 20,0 de Tween 80 e sem glicose.	0,76	96	1,57	168
6) Meio 1 ($g.L^{-1}$) adicionado de 25 óleo de soja; 8,0 de Tween 80 e sem glicose.	1,51	192	0,42	96

Meio 1 ($g.L^{-1}$): 1,0 peptona; 10,0 $(NH_4)_2SO_4$; 10,0 KH_2PO_4; 0,5 $MgSO_4.7H_2O$; 1,0 $CaCl_2$; 5,0 de solução de elementos traços traço (22,0 Zn $SO_4.7H_2O$; 11,0 de H_3BO_3; 5,0 $MnCl_2.4H_2O$; 5,0 $FeSO_4.7H_2O$; 1,6 $CoCl_2.5H_2O$; 1,6 de $CuSO_4.5H_2O$; 1,1 $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$; 50,0 de EDTA) e pH 6,0.

-- Não foi testado.

Observou-se que as maiores produções de enzima por *T. indicae-seudaticae* N31 ocorreram na presença de glicose. Na seqüência dos experimentos optou-se por usar o meio descrito em 3.2 contendo 1,0 $g.L^{-1}$ de glicose, 8,0 $g.L^{-1}$ de Tween 80 e óleo de soja para produção de lipase nessa linhagem.

Nos ensaios com *Rhizomucor pusillus* observou-se a produção de lipase na ausência de glicose. Entre as duas concentrações de emulsificante analisadas, a atividade foi mais expressiva com 20,0 $g.L^{-1}$ de Tween 80, produzindo 1,57 U/mL em 168h. Desse modo, utilizou-se meio sem adição de glicose e com 20,0 $g.L^{-1}$ de Tween 80 para a produção da lipase por esse fungo.

Esses resultados mostram que cada fungo requer uma condição específica de cultivo para a a indução e secreção de lipases, reforçando a importância de se estudar o efeito de algumas condições nos processos fermentativos.

4.2.1 Efeito do tempo de cultivo na produção de lipase pelos fungos selecionados em FSm

Com base no experimento anterior, foi selecionado o meio descrito em 3.2 composto

por 1,0 $g.L^{-1}$ de glicose, contendo 8,0 $g.L^{-1}$ de Tween 80 e óleo de soja, o qual foi utilizado nos ensaios de fermentação com a linhagem *T. indicae-seudaticae* N31. O meio descrito em 3.2 composto por ausência de glicose, contendo 20,0 $g.L^{-1}$ de Tween 80 e óleo de soja foi usado para a linhagem de *R. pusillus*. Foram também usadas outras linhagens cujo o cultivo foi em meio descrito em 3.2 composto em ausência de glicose, contendo 8,0 $g.L^{-1}$ de Tween 80 e óleo de soja. Foi observado, para *T. indicae-seudaticae* N31 a atividade média de 4,32 U/mL em 240h (Figura 1). Dois outros picos menores aparecem em 120h e 192h. Na figura 1A observa-se que o fungo apresentou fase de crescimento logarítmica até 144h coincidindo com o primeiro pico da enzima. O segundo pico de atividade aparece após queda nos valores de biomassa. É possível que a ruptura das hifas tenham liberado enzimas intracelulares e/ou associadas a parede celular. Entretanto, as irregularidades das curvas apresentadas dificultam uma discussão mais precisa sobre os dados.

Rhizomucor pusillus apresentou menor produção de lipase com picos em 48 e 168 h, (0,4 e 1,20 U/mL) (Figura 2A). Diferente do observado por *T. indicae-seudaticae* N31, o crescimento do *R. pusillus* não foi coincidente com a produção de lipase. O crescimento foi máximo a 96h, com quebra abrupta do teor de biomassa sugerindo ruptura das hifas após esse período (figura 2B).

As linhagens *Aspergillus* sp T4.6.2, *Aspergillus* sp T4.6.1 e *Aspergillus* sp T5.1.2, foram os melhores produtores de lipase entre os fungos isoladas de resíduos domésticos e industriais testados por fermentação submersa, embora, tenham produzido quantidades menores de enzima se comparado com *T. indicae-seudaticae* N31. O fungo *Aspergillus* sp T4.6.2 produziu em 96 h, 1,70 U/mL e o pico de produção biomassa foi em 288 h, 1,70 g/50mL (figura 3). A linhagem *Aspergillus* sp T4.6.1 apresentou dois picos de produção de lipase, em 192 h (1,33 U/mL) e em 288 h (1,20 U/mL), e três picos de produção de biomassa, em 24 h (0,89 g/25mL), 144 h (0,83 g/25mL) e 288 h (0,83 g/25mL) (figura 4). O fungo *Aspergillus* sp T5.1.2 produziu em 192 h, 1,70 U/mL de lipase, e em 48 h, 0,60 g/25mL de biomassa (figura 5). O crescimento e a atividade lipolítica foram menores que a observada em *T. indicae-seudaticae* N31.

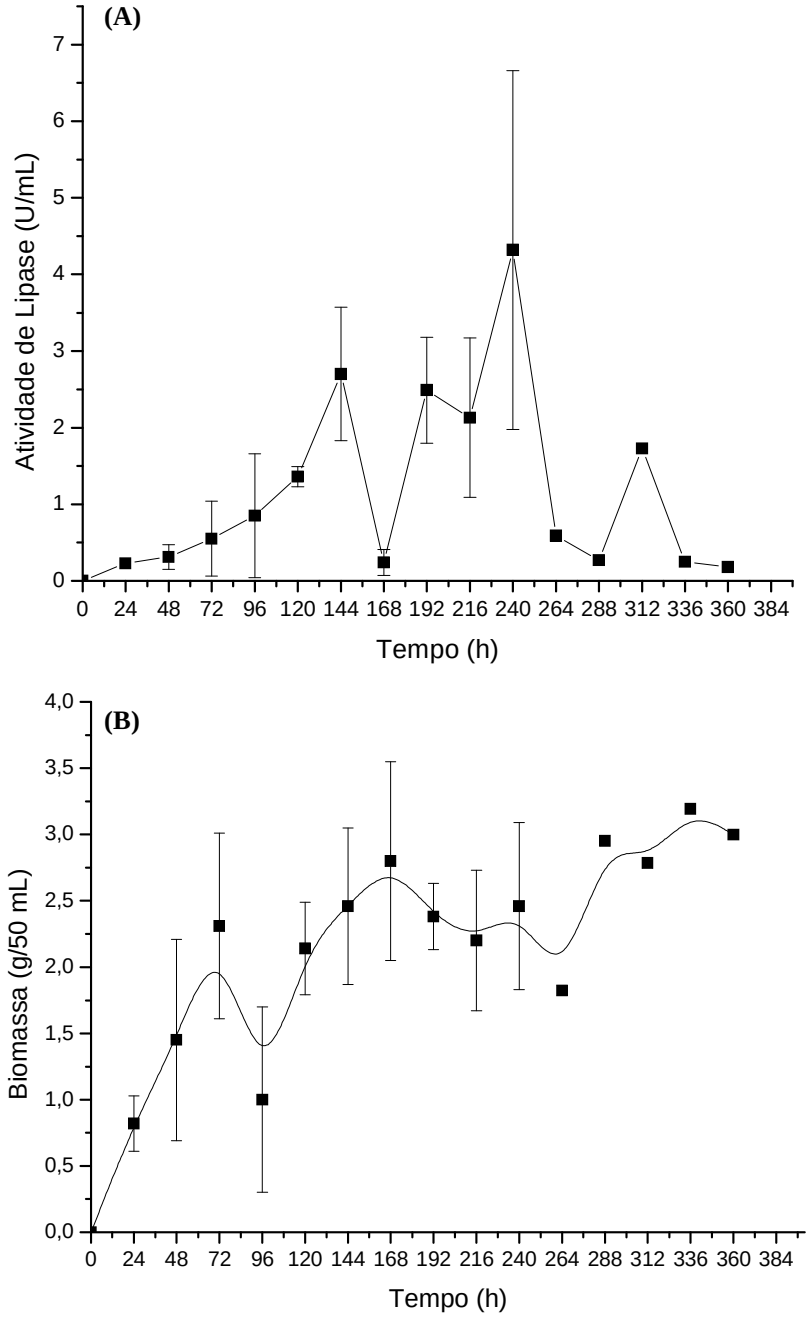


Figura 1. (**A**) Atividade média de lipase em função do tempo de cultivo de *T. indicae-seudaticae* N31; (**B)** Biomassa média produzida por *T. indicae-seudaticae* N31 na fermentação submersa. Meio descrito em 3.2 contendo 1,0 $g.L^{-1}$ de glicose, 8,0 $g.L^{-1}$ de Tween 80 e óleo de soja. Os dados são médias de 2 experimentos.

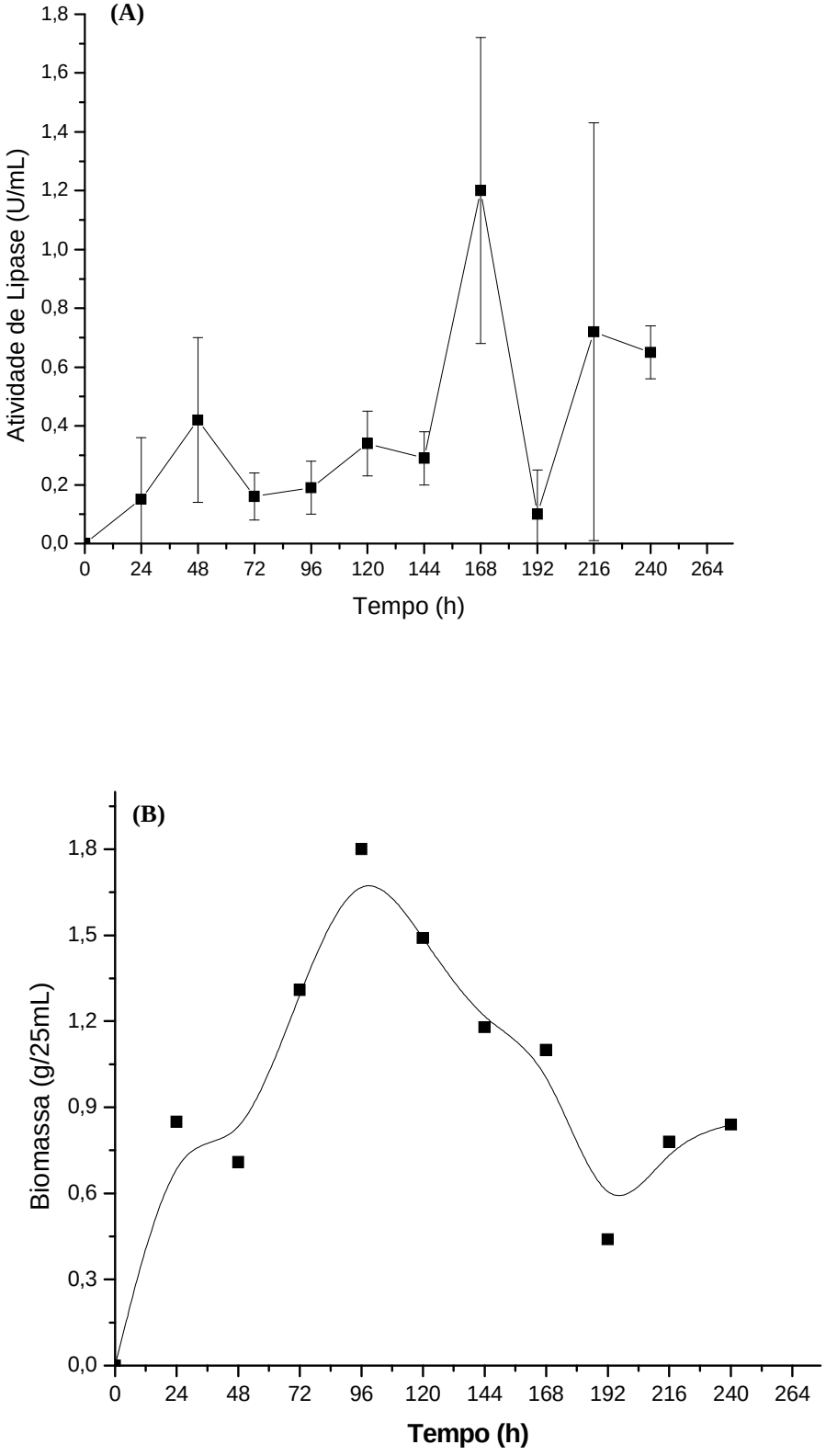


Figura 2. (A) Atividade média de lipase em função do tempo de cultivo de *Rhizomucor pusillus;* (**B)** Biomassa produzida por *Rhizomucor pusillus* na fermentação submersa. Meio descrito em 3.2 contendo 20,0 $g.L^{-1}$ de Tween 80 e óleo de soja. Os dados são médias de 2 experimentos.

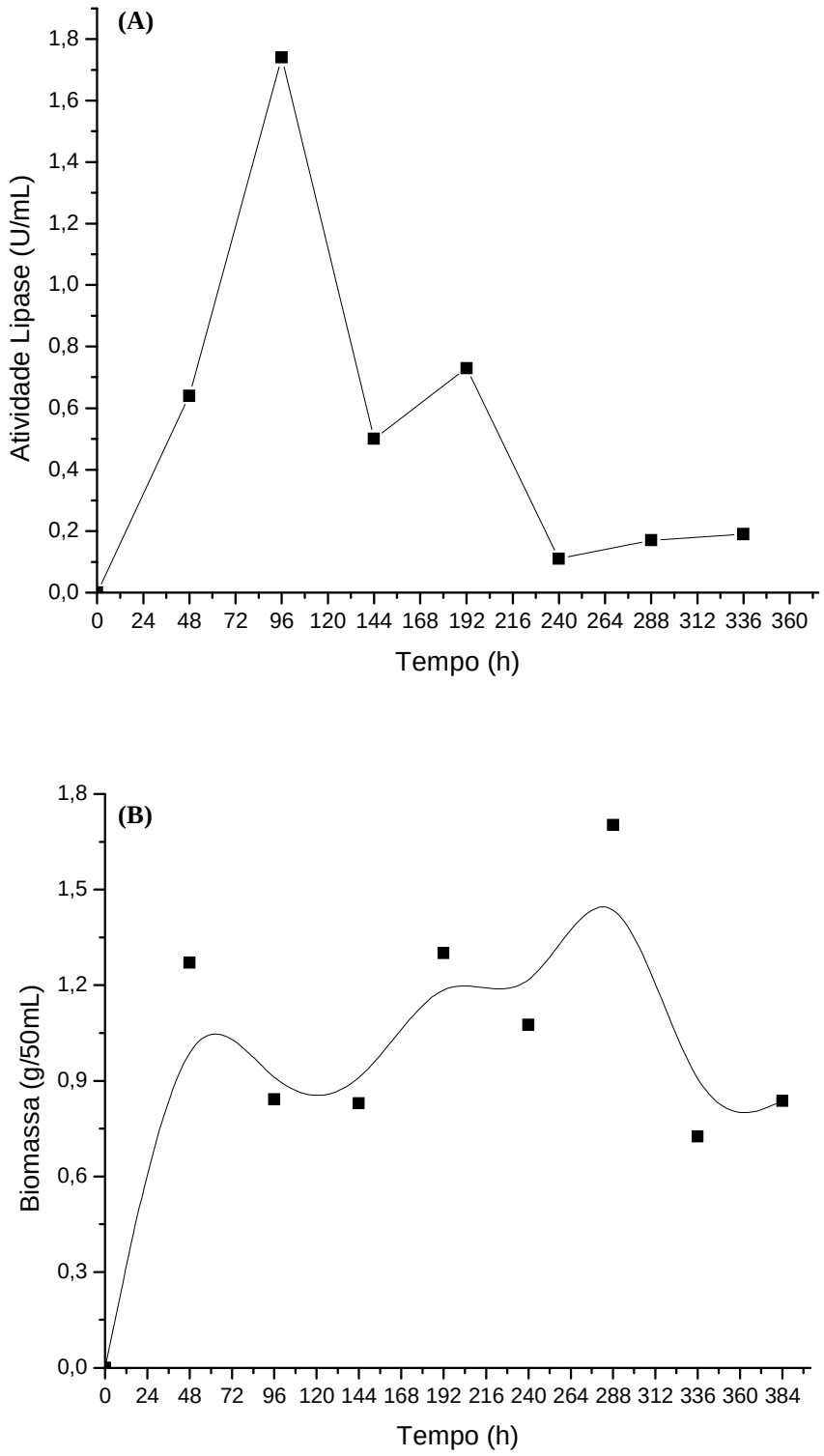


Figura 3. (A) Atividade de lipase em função do tempo de cultivo da linhagem isolada *Aspergillus* sp T4.6.2; **(B)** Biomassa produzida por *Aspergillus* sp T4.6.2 na fermentação submersa. Meio descrito em 3.2 contendo 8,0 $g.L^{-1}$ de Tween 80 e óleo de soja.

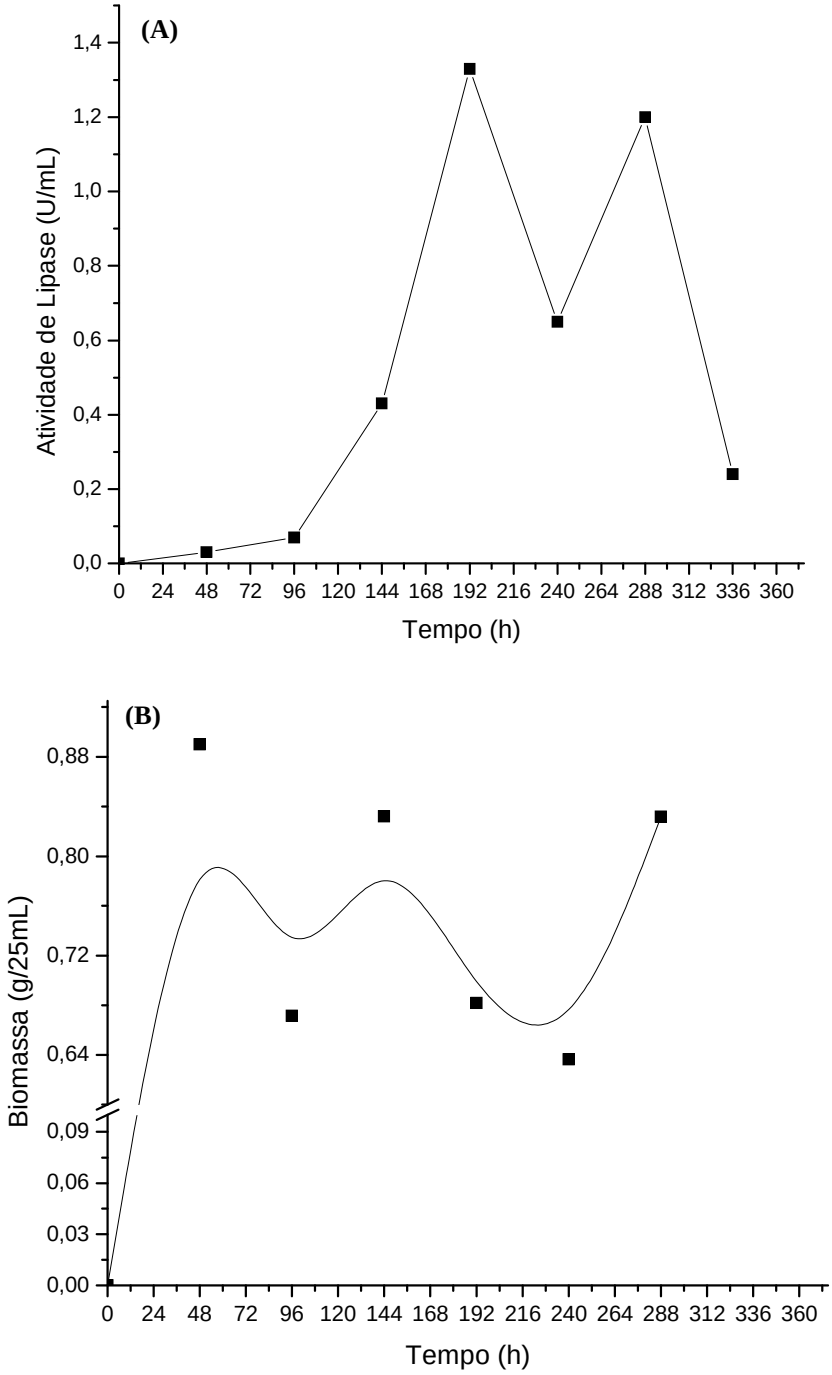


Figura 4. (A) Atividade de lipase em função do tempo de cultivo da linhagem isolada *Aspergillus* sp T4.6.1; **(B)** Biomassa produzida por *Aspergillus* sp T4.6.1 na fermentação submersa. Meio descrito em 3.2 contendo 8,0 $g.L^{-1}$ de Tween 80 e óleo de soja.

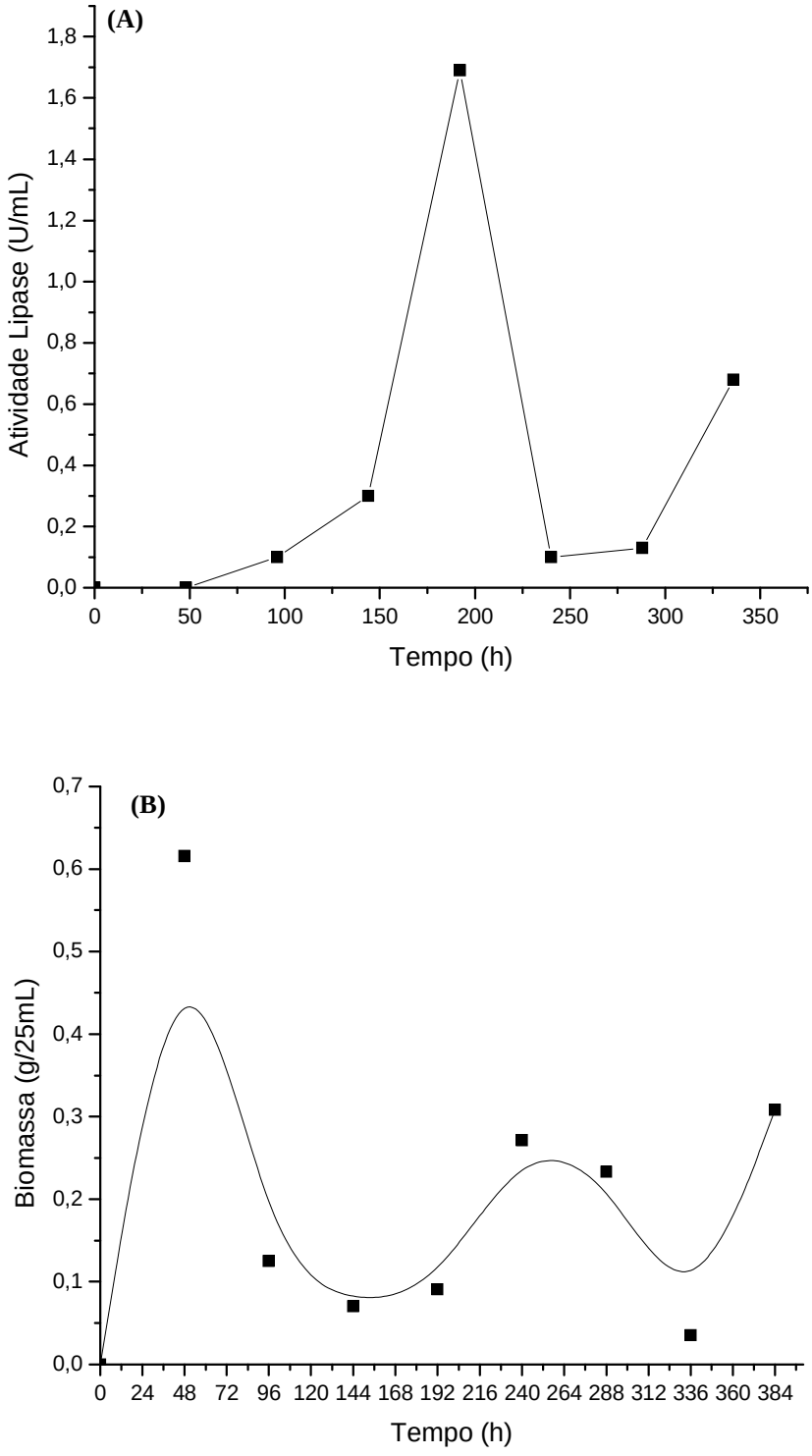


Figura 5. (A) Atividade de lipase em função do tempo de cultivo da linhagem isolada *Aspergillus* sp T5.1.2; (B) Biomassa produzida por *Aspergillus* sp T5.1.2 na fermentação submersa. Meio descrito em 3.2 contendo 8,0 $g.L^{-1}$ de Tween 80 e óleo de soja.

Uma linhagem de fungo mesofílico, *Bothryosphera rodhina*, conhecidamente produtor de lipase (COSTA et al., 2007; MESSIAS et al., 2009), também foi submetido à fermentação

submersa e foi usado como cepa de referência para a produção enzimática. Na figura 6A, observa-se que em 120 h houve produção de 2,20 U/mL de lipase, na literatura de referência essa espécie apresentou produção de 1U/mL em meio contendo óleo de oliva (COSTA et al., 2007). Essa quantidade também foi menor que a obtida de *T. indicae-seudaticae* N31, sugerindo que este último possui grande potencial como produtor de lípases extracelulares.

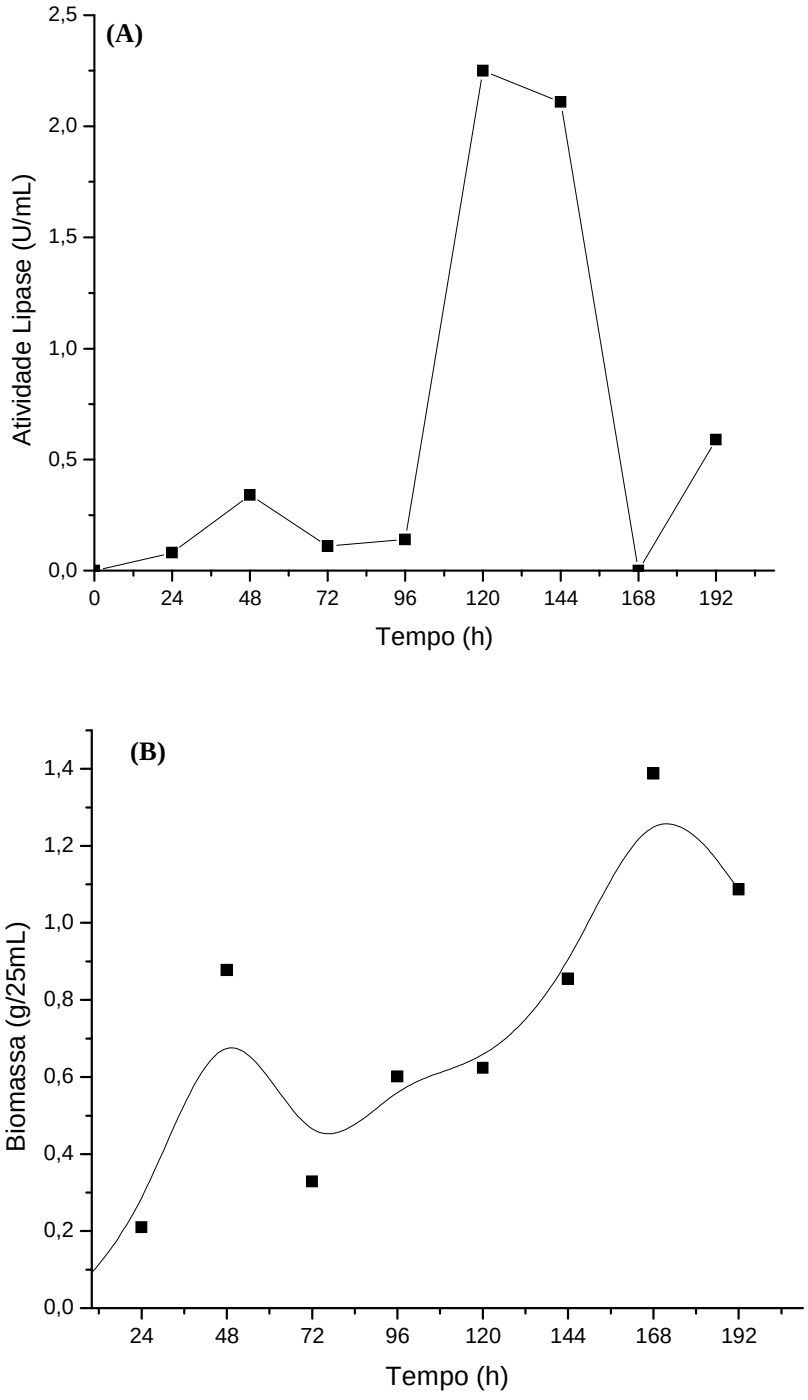


Figura 6. (**A)** Atividade de lipase em função do tempo de cultivo da linhagem isolada *Bothryosphera rodhina*; **(B)** Biomassa produzida por *Bothryosphera rodhina* na fermentação submersa. . Meio descrito em 3.2 contendo 8,0 $g.L^{-1}$ de Tween 80 e óleo de soja.

Os fungos *Aspergillus fumigatus* N12, *Thermomyces lanuginosus* Rob., *Thermoascus aurantiacus* e *Thermomyces* sp T4.2.1 quando submetidos à fermentação submersa não produziram lipase. Entretanto, conforme dados de referências, alguns desses gêneros de fungos geralmente são produtores de lipases alcalinas, o que explicaria a ausência de atividade lipolítica em meio ácido.

Bussamara et al. (2010) observaram valores de 0,38 U/mL de lipase em meio de cultura pelo *Pseudozyma hubeiensis*, 0,35 U/mL para *Debaryomyces occidentalis* e 0,35 U/mL para *Cryptococcus* sp. *Aspergillus carneus* produziu 7,20 U/mL (SAXENA, R. K. et al, 2003) e *Antrodia cinnamomea,* 3,57 U/mL depois de 15 dias de fermentação (LIN, KO, 2005). Em 2005, Alonso e colaboradores, observaram a produção de 5,6U/mL em 240h pela levedura *Yarrowia lipolytica* em meio contendo 1% de óleo de oliva.

Lin e Ko (2005) investigaram o efeito da concentração de glicose na produção de lipase do Basidiomiceto *Antrodia cinnamomea*. A adição de 8% de glicose aumentou drasticamente a atividade lipolítica de 0,59 para 1,25-5,07 U/mL e a biomassa aumentou de 0,7 para 0,86-3,95 mg/mL.

Estudos indicam que as suplementações de meios com glicose e sacarose aumentam a produção de lipase (CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E., 2004). A produção de lipase por muitos outros micro-organismos também foi estimulada com a presença de glicose para *Pseudomonas fragii* (ALFORD, J. A.; PERCE, D.A., 1963), *Aspergillus wentii* (CHANDER, H. et al, 1980), *Mucor hiemalis* (AKHTAR, M. W. et al, 1980), *Burkholderia cepacia* (RATHI et al., 2001).

Rodriguez et al (2006), encontraram alta produção de lipase do fungo termofílico *Rhizopus homothallicus* na presença de óleos. Esse fator é importante, pois torna o óleo uma barata e viável fonte de carbono para produção de lipase em escala industrial.

George et al. (1999) e Lin e Ko (2005) observaram que a obtenção de atividade lipolítica variou com as modificações feitas nas formulações no meio de produção, o que torna válido um estudo para a otimização da produção da enzima.

As linhagens testadas neste trabalho apresentaram produção enzimática dentro dos parâmetros encontrados para várias espécies de fungos em outros trabalhos na literatura. A atividade hidrolítica quantificada para a lipase de *T. indicae-seudaticae* N31 foi a maior observada tanto nos experimentos de detecção em placa quanto para os dados de fermentação submersa, e quando comparados com o encontrado na literatura se mostrou similar a algumas espécies de micro-organismo produtores lipolíticos. Desse modo, esse fungo foi escolhido para o estudo da composição do meio e de algumas condições experimentais.

4.3 Efeito das variações das condições de Fermentação submersa sobre a produção de lipase por *T. indicae-seudaticae* N31

Para esse experimento o fungo *T. indicae-seudaticae* N31 foi cultivado em meio conforme descrito em 3.2 sendo analisados os efeitos da concentração de óleo de soja, glicose no meio, assim como, da temperatura de incubação e do pH inicial do meio sobre a produção de lipase em 240 h de cultivo.

Os dados da figura 7A mostram que houve aumento da produção de lipase na presença óleo de soja no meio entre as concentrações de 1 a 3%. De 5 a 10% de óleo de soja nos meios de cultivo levou a uma redução da atividade lipolítica de cerca de 30%. Observa-se, no entanto, que a presença de óleo não acarretou em grandes alterações no crescimento fúngico (figura 7A).

Normalmente, o óleo é considerado um indutor da produção de lipase, mas pode ser tóxico para algumas linhagens (CIHANGIR, SARYKAYA, 2004). Kamini et al. (2000) relataram que o óleo de soja proporcionou apenas 18,2% de aumento na produção de lipase por *Cryptococcus* sp. Outros resultados semelhantes foram observados para *P. hubeiensis* produziu 0,38 U/mL com adição de óleo de soja ao meio de fermentação (BUSSAMARA et. al., 2010) e para *Geobacillus stearothermophilus* (SIFOUR et al., 2010). Rigo e colaboradores (2010) sugeriram que óleo de soja pode não ser um bom indutor da produção de lipase. Apesar de o óleo ser considerado um indutor da produção de lipases, a variação dos efeitos da adição de lipídeos ao meio de fermentação tem sido estudada por muitos autores, alguns trabalhos revelam que a presença destes pode ser inibitória (GHOSH et al.; 1996).

Condições ótimas de fermentação foram obtidas por Teng e Xu (2008) para a produção de lipase pelo *Rhizopus chinensis* utilizando-se 1,5% de óleo de oliva. Vários autores sugeriram haver um fator limitante na produção de lipase em concentrações superiores a 1,5% de óleo na FSm. No entanto, Rodriguez e colaboradores (2006) não observaram o mesmo com a adição de 4% de em FES.

Diferentes concentrações de glicose também foram testadas. A maior produção de lipase foi obtida com 0,5% de glicose enquanto que, a 1%, observou-se um efeito inibitório (figura 7B). Na produção de lipase por *Antrodia cinnamonea*, os autores demonstraram que a produção da enzima aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração de glicose (até 8%) e não houve produção de enzima na ausência da glicose (LIN et al., 2006). A adição de glicose ao meio também aumentou a produção de lipase de uma linhagem de *A. niger* mutante (MAHADIK et al., 2004). Lin e Ko (2005) demonstrou que a presença de glicose é muito importante na produção de lipase.

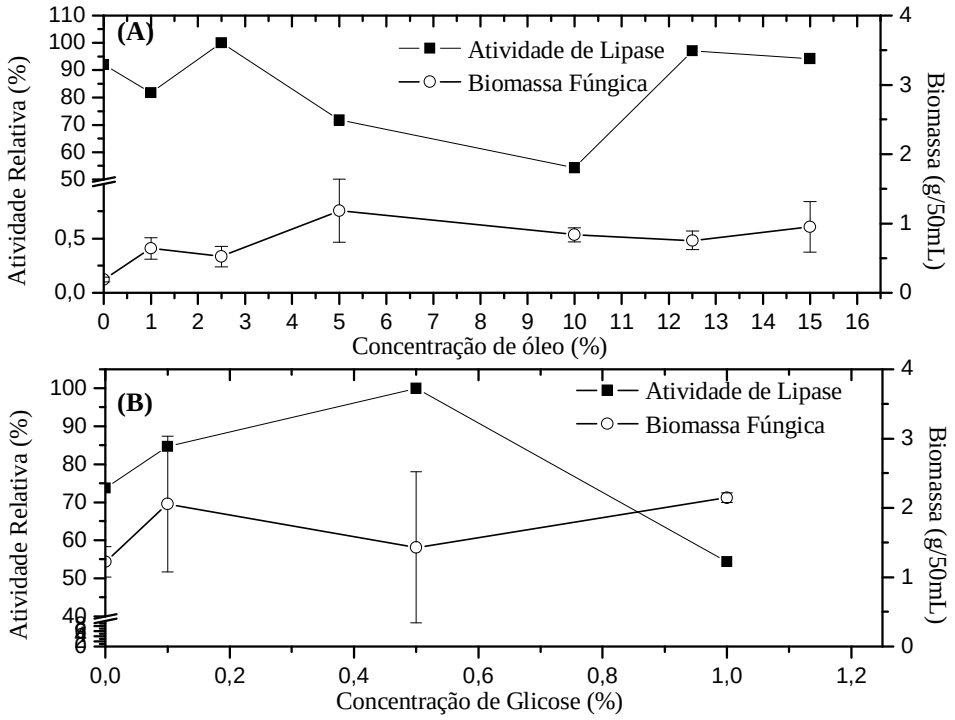


Figure 7. (A) Efeito da concentração de oleo de soja na produção de lipase em fermentação submersa: (o) Biomassa fúngica (g/50 mL meio nutriente); (■) Atividade Relativa (%); **(B)** Efeito da concentração de glicose na produção de lipase por fermentação submersa: (o) Biomassa fúngica (g/50 mL meio nutriente); (■)Atividade Relativa (%). Meio usado descrito em 3.2.

Os efeitos da temperatura (figura 8B) e do pH inicial (figura 8A) do meio de cultivo também foram analisados, sendo a maior atividade de lipase observada em pH 5,5 e a 45 ºC. Destaca-se que essas condições também levaram ao maior crescimento fúngico. Resultado similar foi observado para *Penicillium simplicissimum*, com melhor produção da lipase com pH inicial 5,5 e faixa de temperatura a 32-42 ºC (WOLSKI et al., 2009). *A. cinnamonea* também apresentou melhor produção em pH inicial 5,5 (LIN, KO, 2005). Entretanto, outros fungos produtores de lipase demonstraram maior produção com pH inicial 8,0 (*Rhodotorula glutinis*), pH 7,0 (*Candida rugosa*), pH 7,0 (*Penicillium verrucosum*) e pH 5,6 (*Cryptococcus* sp). De acordo com o descrito na literatura, o pH inicial neutro é normalmente observado nas fermentações (KAMINI et al., 2000). Lipases de fungos termofílicos são pouco estudadas, por isso poucos dados comparativos foram encontrados em relação à temperatura de fermentação.

Podemos observar com os dados apresentados a importância de se estudar alguns parâmetros na fermentação. Para o *T. indicae-seudaticae* N31, o efeito das concentrações de glicose e de óleo de soja, temperatura e pH inicial são parâmetros importantes que certamente

influenciam na produção da enzima.

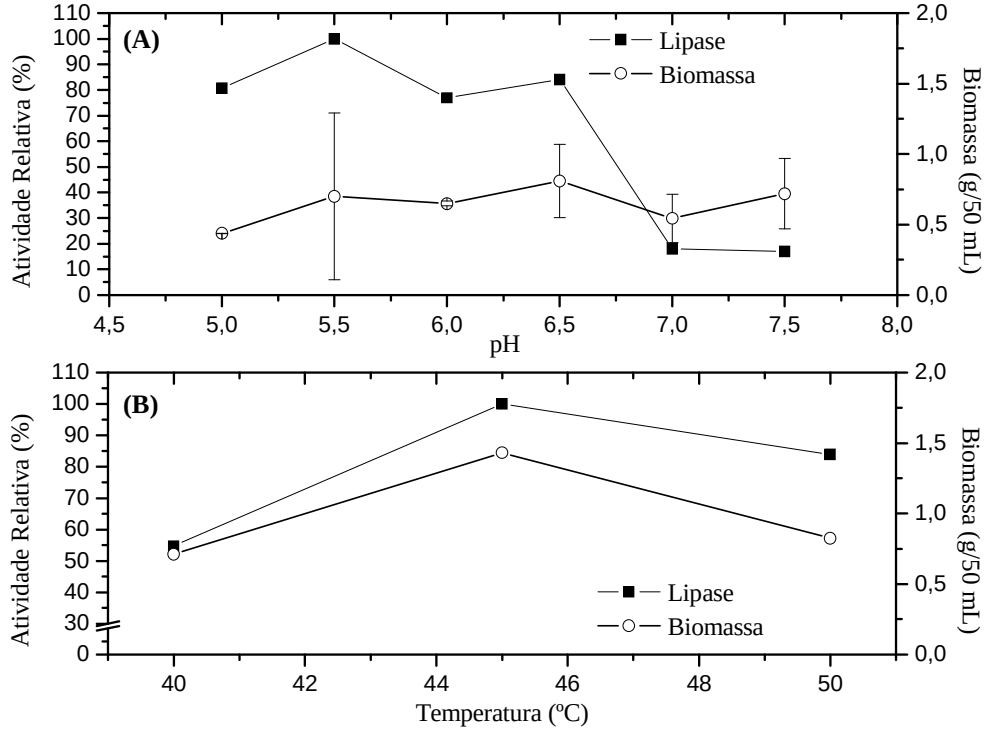


Figure 8. (A) Efeito do pH inicial do meio de cultivo na produção de lipase por fermentação submersa: (o) Biomassa fúngica (g/50 mL meio nutriente); (■) Atividade Relativa (%); **(B)** Efeito da Temperatura na produção de lipase por fermentação submersa: (o)Biomassa fúngica (g/50 mL meio nutriente); (■)Atividade Relativa (%).Meio usado descrito em 3.2.

4.4 Precipitação e SDS-PAGE

As lipases produzidas pelo *T. indicae-seudaticae* N31 em FSm foram submetidas à um fracionamento das proteínas e analisadas em eletroforese SDS-PAGE.

Dados da tabela 3 indicam que o maior rendimento obtido foi com a precipitação do extrato bruto enzimático de *T. indicae-seudaticae* N31 em FSm com 67% de etanol e 75% de acetona. O fator de purificação e o rendimento observado são maiores do que os observado por Liu et al. (2008) (1,5 e 27% respectivamente) para a lipase *A. pullulans* e similar ao encontrado por Sun e Xu (2009) para a lipase de *R. chinensis*.

É importante destacar que não houve perdas significativas na atividade da enzima para as concentrações destacadas, especialmente na presença de acetona. Pode ser um indicativo que a enzima seja tolerante a alguns solventes orgânicos. Essa característica é relevante para algumas aplicações industriais.

Tabela 3. Precipitação do extrato bruto da lipase de *T. indicae-seudaticae* N31 produzida por FSm.

Precipitação	Proteina Total (mg)	Atividade Lipolitica Total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
Etanol					
Extrato Bruto	0,71	1,33	1,88	1,00	100
50%	0,03	0,50	15,89	8,44	37,68
67%	0,03	0,75	25,19	13,37	56,51
75%	0,30	0,46	1,54	0,82	34,68
80%	0,25	1,04	4,24	2,25	78,40
Acetona					
Extrato Bruto	0,71	1,33	1,88	1,00	100
50 %	0,10	0,61	6,38	3,39	46,22
67%	0,34	1,10	3,28	1,74	82,65
75%	0,16	0,96	6,15	3,26	72,31
80%	0,37	0,95	2,56	1,36	71,15

Após as análises de proteína e atividade, as amostras precipitadas foram submetidas a um zimograma SDS-PAGE, no qual foi corado primeiramente com corante específico de esterase (α–β-naphtyl na presença de fast blue) e depois submetido à coloração com prata para visualização do padrão de massa molar e de outras proteínas contaminantes presentes no extrato bruto.

Na figura 9 destaca-se a massa molar para as amostras precipitadas com etanol da FSm é de aproximadamente de 66KDa. Esse dado está de acordo com o relatado na literatura, sendo de aproximadamente 63KDa para a lipase nativa de *Rhizopus chinensis* e de 63,5 KDa para a lipase *A. cinnamomea*. Trabalhos na literatura relatam que a maiorias das lipases extracelulares de levedura possuem uma massa molar variando de 33 e 65KDa (LIU et al., 2008; SUN, XU, 2009). Podemos observar também que apesar de a precipitação não ter eliminado outras proteínas contaminantes, as frações se apresentam bem separadas o que poderia facilitar a uma futura purificação da enzima.

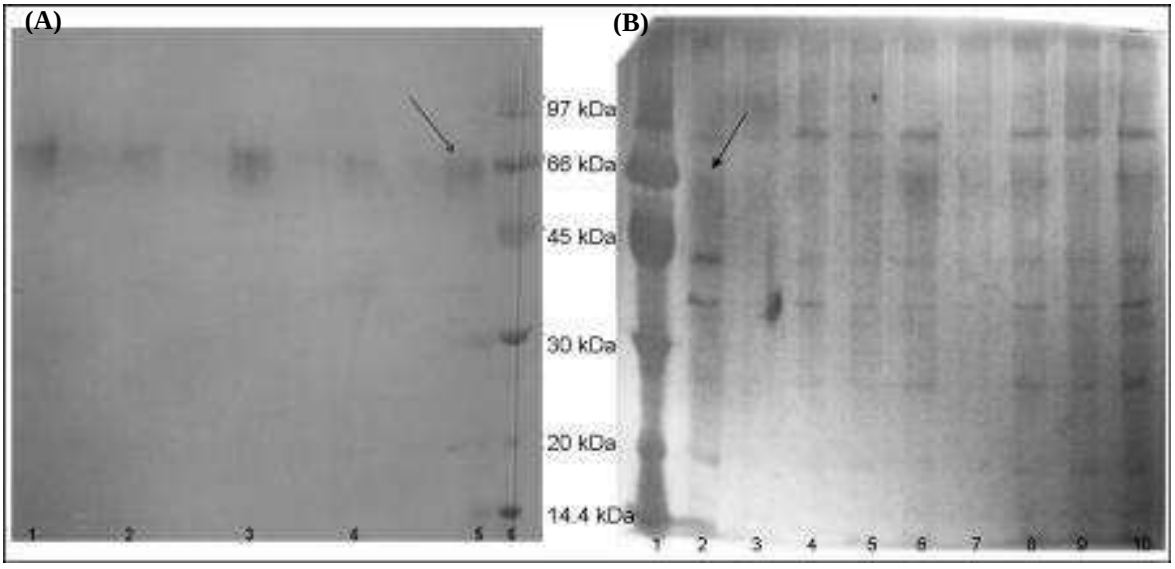


Figure 9. (A) Zimograma SDS-PAGE (poliacrilamida 15%) corado com corante específico α–β-naphtyl na presença de fast blue: (1-4) frações de lipase submetidas à precipitação; (5) Extrato bruto; (6) padrão de baixa massa molar; **(B)** Eletroforese submetida à coloração com prata; (1) de baixa massa molar; (2) Extrato bruto; (3-10) frações de lipase submetidas à precipitação (de acordo com a tabela 3);

II.5 CONCLUSÃO

Podemos considerar que a seleção de fungos termofílicos realizada neste trabalho apresentou dados positivos, pois foi feito um levantamento entre os fungos termofílicos da coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada e podemos eleger várias linhagens como produtoras de lipase, que poderão ser utilizadas em projetos futuros.

Foi considerada a presença de glicose, a presença de óleo, a temperatura e o pH inicial do meio, como fatores fundamentais na produção de lipase por FSm. Esses dados mostram a importância de se estudar os efeitos dos componentes dos meios nas fermentações.

As precipitações realizadas com as enzimas produzidas em FSm pelo *T. indicae-seudaticae* N31 indicaram razoável fator de purificação e bons rendimentos. As análises eletroforéticas indicaram que possivelmente a massa molar da lipase dessa linhagem produzida por FSm é de aproximadamente de 66 KDa e que está de acordo com o relatado na literatura. Podemos concluir que todos os ensaios realizados foram relevantes à título de conhecimento das características de produção da enzima pelo fungo selecionado.

II.6 REFERÊNCIAS

AKHTAR, M. W. et al. Lipase Induction in *Mucor hiemalis*. **Applied and Environmental Microbiology,** V. 40, N. 2, P. 257-263, 1980.

ALFORD, J.A.; PERCE, D. A. Production of lipase by *Pseudomonas fragi* in a synthetic medium. **The Journal of Bacteriology**, v. 86, p. 24-29, 1963.

ALONSO, F.O.M. et al. Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 1, p. 9-18, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye bindind. **Analitical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUSSAMARA, R. et al. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 268-275, 2010.

CASTRO-OCHOA, L .D. et al. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR 11. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 648-654, 2005.

CHANDER, H. et al. Factors affecting lipase production in *Aspergillus wentii*. **Journal of Food Science**, v. 45, n. 3, p. 598- 600, 1980.

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

COSTAS, M. et al. Lipolytic activity in submerged cultures of *Issatchenkia orientalis*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2109-2114, 2004.

FADILOGLU, S.; ERKMEN, O. Lipase production by *Rhyzopus oryzae* growing on different carbon and nitrogen sources. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p.1936-1938, 1999.

FUCIÑOS, P. et al. Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* B27: Partial purification and preliminary biochemical characterization. **Journal of Biotechnology**, v. 117, p. 233-241, 2005.

GEORGE E. et al. Influence of growth medium composition on the lipolytic enzyme activity of *Ophiostoma piliferum* (CartapipTM). **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, p. 137-140, 1999.

GHOSH, P. K. et al. Microbial lipases: production and applications. **Science Progress**, v. 79, n. 2, 119-157, 1996.

HASAN, F. et al. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251,2006.

IMAMURA S, KITAURA S. Purification and characterization of a monoacylglycserol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H-257. **J Biochem**, v. 127, p. 419–425, 2000.

JANDA, K. The lipolytic activity of *Thermomyces lanuginosus* strains isolated from different natural sources, **International Biodeterioration & biodegradation**, v. 55, p. 149-152, 2005.

JENSEN, B. et al., Enzyme production in continuous cultivation by the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus.* **Biotechnology Letteers**, 24, 41-45, 2002.

JOSEPH, B. et al. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 26, p.457-470, 2008.

KAMINI, N. R. et al. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp S-2, **Process Biochemistry,** v. 36, p. 317-324, 2000.

KOUKER, G., JAEGER, K. E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 211-213, 1987.

KRIEGER, N. **Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum***. Curitiba. 1995. 260 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

LIMA, V. M.G. et al. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 31, p. 53-61, 2004.

LIN, E. S. et al. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture, **Enzyme and Microbial Technology,** v. 39, p. 98-102, 2006.

LIN, E.S.; KO, H. C. Glucose stimulates production of the alkaline-thermostable lipase of the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 261-265, 2005.

LIU, Z. et al. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochemical Engeneering Journal**, v. 40, p. 445-451, 2008.

MAHADIK, N. D. et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.

MAHADIK, N. D. et al. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation, **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2031-2034, 2004.

MESSIAS, J. M. et al. Screening *Bothryosphaeria* species for lípases: Production of lipase by *Bothryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p.426-431, 2009.

MOZHAEV V. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. **Trends Biotechnol**, v.11, p.88–95, 2003.

NAGY, V. et al. Kinetics resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 141-148, 2006.

QUADROS, C. P. et al. Fusarium oxisporum alkaline lipase production using industrial residues as alternative medium components. **Journal of Biotechnology**, v. 131S, p. S133-S187, 2007.

RATHI, P. et al. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 187-192, 2001.

RIGO, E. et al. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements, **Food Science and Technoogy**, v. 43, p. 1132-1137, 2010.

RODRIGUEZ, J.A. et al. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2264-2269, 2006.

SANDHYA, C. et al., Comparative evalution of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry,** 40, 2689-2694, 2005.

SANDOVAL, G.; MARTY, A. Screening methods for synthetic activity of lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 390-393, 2007.

SAXENA, R. K.; DAVIDSON, W. S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 239-247, 2003.

SIFOUR, M. et al. Enhanced production of lipase by the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5 using statistical experimental designs, **New Biotechnology**, (DOI: 10.1016/j.nbt.2010.04.004) in press 2010.

SUN, Y. S.; XU, Y. Membrane-bound "synthetic lipase" specially cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative investigation. **Bioresouce Technology**, v. 100, p. 1336-1342, 2009.

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.

VILLENEUVE P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by Serratia marcescens. **The Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

WOLSKI, E. Partial characterization of lipases produced by a newly isolated Penicillium sp.

in solid state and submerged fermentation: A comparative study. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 1557-1560, 2009.

CAPÍTULO III:
SELEÇÃO DE FUNGOS TERMOFÍLICOS PRODUTORES DE LIPASE EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

III.1 INTRODUÇÃO

A produção de lipases (EC 3.1.1.3) tem alcançado grande interesse nas ultimas décadas. Devido as suas propriedades diferenciais, essas enzimas possuem um amplo potencial de aplicação, sendo utilizadas em indústria de alimentos, cosméticos, oleoquímica, farmacêutica, na síntese de detergentes, no tratamento de águas residuais e no setor de combustíveis (CASTRO et al., 2004; SHARMA et al., 2001).

Novas lipases microbianas vem sendo isoladas de espécies termofílicas e psicrofílicas. A procura por lipases é encorajada pela grande demanda de enzimas altamente ativas e específicas pela indústria (COSTAS et al., 2004). Essas enzimas, geralmente, são obtidas por meio de fermentação submersa. No entanto, a FES é uma alternativa para a produção de enzimas microbianas, devido a possibilidade de se utilizar resíduos agro-industriais como fonte de nutriente e/ou como suporte para o desenvolvimento fúngico. Esse tipo de substrato diminui o custo da produção da enzima (PANDEY, 2003; RODRÍGUEZ et al., 2006; RIGO et al., 2010). FES é um sistema de fermentação envolvendo sólidos e ausência de água livre entre partículas e requer equipamentos mais simples, resultando em uma menor demanda de energia (PANDEY, 2003; EDWINOLIVER et al., 2010).

Recentemente, tem se estudado o uso de indutores na produção de lipase por essa técnica. Vários fatores podem afetar a biosíntese enzimática, como fontes de carbono e nitrogênio, a presença de compostos lipídicos e surfactantes, temperatura, aeração, pH e composição do meio. Os objetivos desse tipo de investigação é aumentar o rendimento na produção da enzima utilizando um processo de fermentação que pode ser economicamente viável. A diminuição dos custos da produção de enzima pode torná-la economicamente mais viável, competindo com catalisadores químicos difundidos na indústria (SHARMA et al., 2001).

III.2 OBJETIVOS

O objetivo dessa etapa do trabalho foi selecionar fungos termofílicos produtores de lipase e estudar a produção da enzima em fermentação em estado sólido.

2.1 Objetivos específicos

- Seleção de fungos filamentos termofílicos produtores de lípase: fermentação em estado sólido (FES);

- Estudo da composição do meio e das condições de fermentação em FES para cultivos fungos selecionados como melhores produtores de enzima.

III.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção de Micro-organismos Termofílicos

A seleção de micro-organismos termofílicos produtores de lipase foi realizada por fermentação em estado sólido (FES). As seguintes linhagens termofílicas foram testadas *Thermomyces lanuginosus* Rob., *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756, *Rhizomucor pusillus*, *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, *Myceliophthora* sp F2.1.4, *Myceliophthora* sp F2.1.3, *Myceliophthora* sp F2.1.1, *Thermomyces lanuginosus* TO-03, *Thermomyces lanuginosus* TO-05 e *Thermomyces lanuginosus* Rob. Além dessas foram testadas linhagens ainda não identificadas. Todas essas cepas foram isoladas em trabalhos prévios do grupo de Pesquisa em Enzimas microbianas e fazem parte da coleção de trabalho do laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da Unesp do Campus de São José do Rio Preto/SP.

3.2 Meios de cultura (Pré-Inóculo)

Para os cultivos das linhagens fúngicas foi utilizado meio nutriente modificado de Castro-Ochoa et al. (2005) contendo ($g.L^{-1}$): 1,0 peptona; 10,0 $(NH_4)_2SO_4$; 10,0 KH_2PO_4; 0,5 $MgSO_4.7H_2O$; 1,0 $CaCl_2$; 25 óleo de soja; 8,0 de emulsificante (Tween 80); 5 de solução de elementos traços (22,0 Zn $SO_4.7H_2O$; 11,0 de H_3BO_3; 5,0 $MnCl_2.4H_2O$; 5,0 $FeSO_4.7H_2O$; 1,6 $CoCl_2.5H_2O$; 1,6 de $CuSO_4.5H_2O$; 1,1 $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$; 50,0 de EDTA) e corrigindo-se o pH para 6,0. Para os meios sólidos acrescentou-se 30,0 $g.L^{-1}$ de ágar (a porcentagem maior de ágar que a usual de 20,0 $g.L^{-1}$ serve para diminuir a fluidez do meio a temperaturas altas).

3.3 Fermentação em estado sólido (FES)

A FES foi realizada em sacos de polipropileno (26,5 cm x 15 cm) contendo 10g de bagaço de cana-de-açúcar. O Pré-inóculo foi obtido a partir do cultivo dos fungos por 3 dias em meio sólido descrito em 3.2, sendo adicionado 100 mL de solução nutriente para a suspensão micelar e inoculado 25 mL em cada saco. Esse volume inferiu uma umidade de 70% ao substrato. A incubação ocorreu a 45ºC por 72h. A obtenção da solução enzimática bruta foi feita com adição de 100 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 (0,05 M) ao material fermentado, o qual

foi misturado levemente, agitado a 100 rpm por 30 min, e filtrado à vácuo. O filtrado foi centrifugado a 10.000g, 10ºC, 20 min e o sobrenadante utilizado como solução enzimática bruta.

3.3.1 Estudo da variação das condições de FES sobre a produção de lipase

A FES foi realizada como o descrito em 3.3 com algumas modificações: foram utilizados sacos de polipropileno menores (21 cm x 12 cm) contendo 5g de substrato; ao qual foram adicionados 50 mL de suspensão de esporos em água destilada estéril. Além da suspensão de esporos como inóculo, foram adicionados mais 25 mL de solução nutriente ao material o qual foi incubado a 45 ºC. Nesse experimento a solução enzimática bruta foi obtida por adição de 50 mL de água destilada.

Seguindo a metodologia descrita no parágrafo anterior, uma solução nutriente padrão contendo 20 $g.L^{-1}$ de peptona, 2 $g.L^{-1}$ de K_2HPO_4 e 0,5 $g.L^{-1}$ de $MgSO_4$ foi usada e novos dos componentes foram adicionados nessa solução nutriente a fim de melhorar a produção da enzima:

- Substrato sólido: 5g de bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e de soja;
- Fonte suplementar de nitrogênio: 20 $g.L^{-1}$ uréia, NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3 e extrato de levedura;
- Fonte suplementar de carbono: frutose, glicose, lactose, xilose, sacarose, ausência de açúcar, glicerol, óleo de soja, oliva, girassol, algodão e canola;
- Quantidade de esporos: $5x10^5$, $5x10^6$, $5x10^7$ unidades formadoras de colônia;
- Variação da concentração da fonte de nitrogênio e açúcar ($g.L^{-1}$): 1:1; 2:2; 2:1; 1:2 e 3:3.
- Tipos de solução de extração: água destilada; tampão fosfato 0,02M pH7; 1, 5 e 10 $g.L^{-1}$ de Triton X-100;
- Volume de solução nutriente e volume da solução de extração.
- Temperatura de fermentação: 40-50 ºC.

3.4 Quantificação da atividade de lipase por hidrólise de sustrato cromogênico

Este método de hidrólise foi proposto por Winkler e Stukmann (1979), sendo modificado conforme Krieger (1995). O substrato sintético utilizado, o *p*-nitrofenil palmitato (*p*NPP), é hidrolisado pela enzima, em meio aquoso contendo como emulsificantes a goma

arábica e o Triton X-100. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1 μmol de *p*NP (*p*nitrofenol) por min nas condições da reação. O coeficiente de extinção molar do *p*NP utilizado foi $8{,}03.10^{-3}M.L^{-1}$ (LIMA et al., 2004).

Soluções Utilizadas:

- Solução A: *p*-nitrofenil palmitato em isopropanol, em uma concentração de 3 mg/mL.
- Solução B: 2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica, em 450 mL tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0.

A 9 mL da solução B foi misturado 1 mL da solução A, lentamente e sob contínua agitação, para o preparo da solução de substrato. Foi utilizado 0,9 mL da solução pronta e adicionado 0,1 mL do extrato enzimático. A reação foi incubada a uma temperatura de 45 °C por 1 minuto, e a absorção foi lida em espectrofotômetro a 410 nm.

3.5 Proteína Total

A determinação da concentração de proteínas totais da solução enzimática bruta e da solução fracionada foi feita através do método de Bradford (1976), usando soroalbumina bovina como padrão.

3.6 Precipitação

A solução de proteínas da solução enzimática bruta foi fracionada com álcool ou acetona gelado a concentrações de 50, 67, 75 e 80% e deixado por 24h. O precipitado foi separado por centrifugação (10.000 g por 20 min a 6ºC) e ressuspenso em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0. Os testes de atividade de lipase do sobrenadante e do precipitado foram realizados conforme o descrito no item 3.4 e quantificação de proteína total conforme descrito no item 3.5. O rendimento foi calculado dividindo-se o valor de atividade total do material fracionado pela atividade total da enzima bruta (inicial) e multiplicado por 100. O fator de purificação foi obtido pela divisão da atividade específica do material fracionado pela atividade específica da enzima bruta.

3.7 Eletroforese

Zimograma SDS-PAGE foi realizado de acordo com Fuciños et al. (2005) utilizando um gel de poliacrilamida a 15% com 0,1% de SDS (dodecil sulfato de sódio). A detecção de lipases foi feita com uma solução corante contendo α- e β-naftil acetato na presença de fast blue. Um kit (SIGMA) padrão de baixa massa molar de proteínas foi utilizado: Fosforilase b

(97 kDa), Albumina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anidrase Carbônica (30 kDa), Inibidor de Tripsina (20 kDa), α–lactoalbumina (14.4 kDa). Para detecção de outras proteínas foi utilizada solução corante de prata.

III.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fermentação em Estado Sólido (FES)

A tabela 1 relaciona os fungos testados para as produções de lipase obtidas em FES. Algumas amostras foram liofilizadas utilizando-se 200 ml de amostra cujo material foi ressuspenso em 10 mL de tampão fosfato de sódio pH 7 (0,05 M), resultando numa concentração de 4 a 24 vezes dependendo da amostra.

Os fungos *Rhizomucor pusillus*, *Myceliophthora* sp F2.1.4, *Myceliophthora* sp F2.1.1, *Myceliophthora* sp F2.1.3, F2.3.2, *Thermomyces lanuginosus* TO-05, *Thermomyces lanuginosus* TO-03, *Thermomyces lanuginosus* ROB e *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 foram os melhores produtores de lipase entre os 34 fungos analisados. Contudo, a produção foi baixa se comparada aos valores encontrados na literatura, para *Rhizopus homothallicus*, com produtividade de 595 U/g DM (RODRIGUEZ et al., 2006) e *Rhizopus chinensis* por volta de 570 U/Kg (SUN, XU, 2008). Entretando, para *Penicillium megaterium* os autores obtiveram atividade hidrolítica de 36 U/mg (LIMA et al., 2004).

Tabela 1. Relação dos fungos testados, e apresenta os dados de crescimento de meio com óleo e as atividades produzidas por (FES) e após liofilização.

	Linhagens	***Crescimento Meio com óleo***	***Atividade – extrato líquido (U/g)***	***Atividade – Liofilizada (U/g)***
1	F1.3.1	X	0,35	3,05
2	F1.3.3	X	0,15	-
3	F1.5.1	X	0,25	6,20
4	*Myceliophthora* sp F2.1.1	X	1,05	4,15
5	*Myceliophthora* sp F2.1.3	X	0,90	3,35
6	*Myceliophthora* sp F2.1.4	X	1,00	2,85
7	F2	X	0,45	-
8	F2.2.4	X	0,30	3,95
9	F2.3.2	X	1,16	-
10	F3.1.1	X	0,45	-
11	F3.2.1	X	0,35	-
12	F4.1.3	X	0,20	-
13	F4.9	X	0,25	-
14	F4.9.2	X	0,25	4,20
15	F4.10	-	-	-
16	F5.1	X	-	-
17	F5.1.3	X	0,40	4,10
18	F5.3	X	0,30	-

19	F5.4	X	0,60	2,85
20	F5.5	X	0,25	
21	F5.7	X	0,65	0,70
22	F5.8	X	0,75	1,95
23	F5.11	X	0,65	4,30
24	T2.2.2	X	3,30	
25	T2.3	X	0,35	1,65
26	T4.2.1	X	-	-
27	T4.7.1	X	0,20	0,20
28	*Thermoascus aurantiascus*	-	-	-
29	*Thermomucor indicae-seudaticae* N31	X	1,20	-
30	*Thermomyces lanuginosus* TO-03	X	1,23	-
31	*Thermomyces lanugiosus* TO-05	X	1,58	-
32	*Thermomyces lanugiosus* ROB	X	1,22	-
33	*Mucor*	X	-	-
34	*Rhizoumucor pusillus*	X	1,60	-

A cepa *Myceliophthora* sp M7.7 também foi fermentada, obteve-se uma produção de lipase de 78,50 U/g.

4.2 Estudo das condições da Fermentação em Estado Sólido por *T. indicae-seudaticae* N31 e *Rhizomucor pusillus*

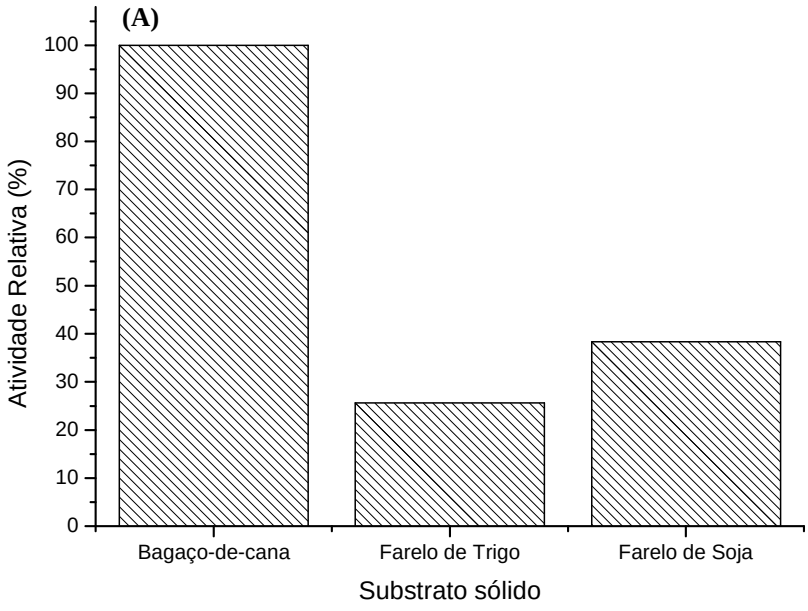
A Fermentação em Estado Sólido (FES) vem sendo bastante estudada e aplicada, por ser um processo economicamente viável no qual são utilizados materiais de baixo custo como substrato, especialmente no Brasil que possui abundância de resíduos agroindustriais e biomassa. Outra vantagem seria uma menor demanda de energia e um maior rendimento, que pode ser confirmado pelos dados apresentados no item anterior (4.1) deste trabalho. Quando optamos por utilizar a FES na produção de lipase observamos valores maiores de atividade hidrolítica pelos fungos estudados.

Desse modo, *T. indicae-seudaticae* N31 e *Rhizomucor pusillus* foram escolhidos para a realização de um estudo das condições da FES, por estarem entre as melhores cepas produtoras de lipase em FES e como um estudo comparativo, entre os processos fermentativos.

A suplementação do meio de cultura pode influenciar positiva ou negativamente no rendimento enzimático. Alguns autores observaram um aumento na síntese da enzima

utilizando-se algumas fontes de nitrogênio, como peptona e extrato de levedura, no processo de fermentação pela *Candida rugosa* (FADILOGLU, ERKMAN, 1999). Óleo de oliva foi utilizado como fonte de carbono na fermentação por *Candida deformans* e *Yarrowia lipolytica* (NOVOTNY et al., 1988) e ausência do óleo por *Hansenula anomala* (BANERJEE et al., 1985). Entretanto, fontes de nitrogênio apresentaram um efeito inibitório para as linhagens *Yarrowia lipolytica* (CORZO, REVAH, 1999; PEREIRA-MEIRELLES et al., 1997), *Geotrichum candidum* (TURKI et al., 2009) e *Rhizopus homothallicus* (RODRIGUEZ et al., 2006).

Na figura 1 são apresentadas as atividades relativas (extração feita com 50 mL de água) obtidas pelo *T. indicae-seudaticae* N31, utilizando-se 20,0 $g.L^{-1}$ de peptona, 2,0 $g.L^{-1}$ de K_2HPO_4, 0,5 $g.L^{-1}$ de $MgSO_4$ e 20,0 $mL.L^{-1}$ de óleo oliva como solução nutriente. Nota-se que a utilização de bagaço de cana-de-açúcar como suporte (figura 1A), e a solução de inoculo contendo $5x10^5$ esporos (figura 1B) proporcionaram maior produção da enzima.



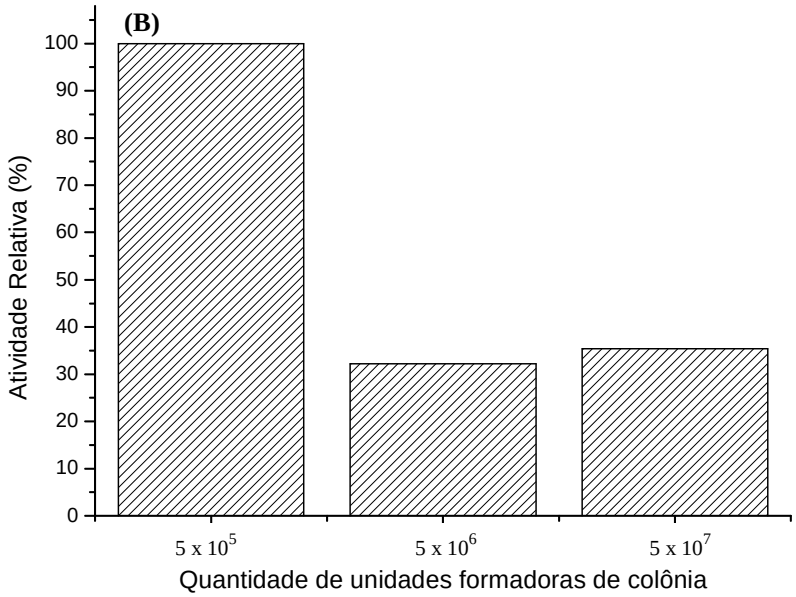


Figura 1. Efeito do substrato sólido e da quantidade de inoculo sobre a produção de lipase *Thermomucor indicae-seudaticae* N31: **(A) s**ubstrato sólido; **(B)** quantidade de esporos inoculada.

Também foram realizados ensaios para avaliação da fonte de nitrogênio suplementar. A solução nutriente descrita em 3.3.1 adicionada de 20 $g.L^{-1}$ de cada fonte de nitrogênio testada (figura 2A) foi usada em bagaço de cana-de-açúcar e $5x10^5$ esporos. Entre os compostos testados, o NH_4Cl foi o que resultou em maior atividade. A concentração NH_4Cl também foi testada. Na figura 2B, observa-se que 10 $g.L^{-1}$ de NH_4Cl foi a melhor concentração para a produção de lipase.

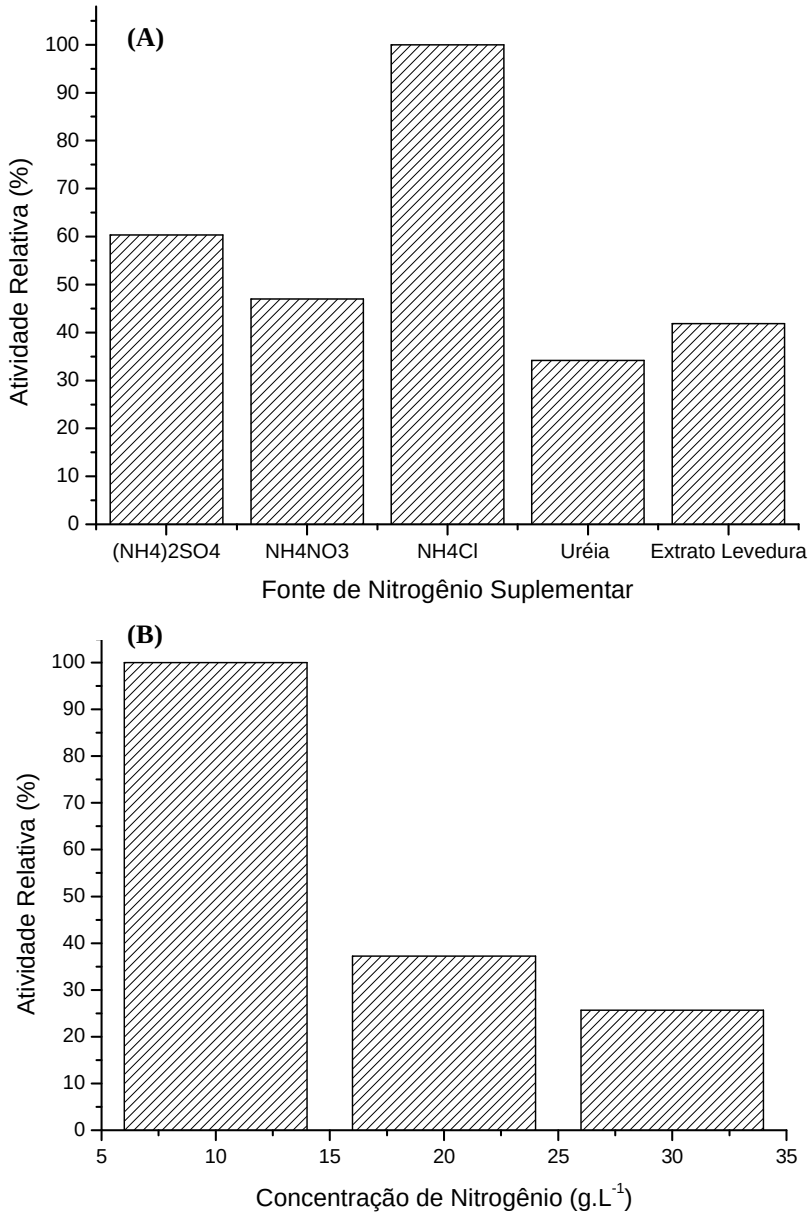


Figura 2. Efeito da composição dos meios de cultura inoculo sobre a produção de lipase *Thermomucor indicae-seudaticae* N31: **(A)** Fonte de nitrogênio suplementar; **(B)** Concentração de Nitrogênio ($g.L^{-1}$).

Como fonte de carbono, os açúcares foram avaliados, sendo usada a solução nutriente descrita em 3.3.1 contendo 20 $g.L^{-1}$ de NH_4Cl, bagaço de cana-de-açúcar e $5x10^5$ esporos (figura 3A). Para essa linhagem a ausência de açúcar foi a condição que propiciou maior atividade relativa. Também foram testados vários tipos de óleo como fonte de carbono, sendo usada a solução nutriente descrita em 3.3.1 contendo 10 $g.L^{-1}$ de NH_4Cl, bagaço de cana-de-açúcar e $5x10^5$ esporos e 20 $mL.L^{-1}$ de cada óleo testado (figura 3B). O óleo de soja foi o melhor para esta linhagem, nota-se que os óleos de canola e girassol também apresentaram altos valores de atividade relativa (em torno de 80%).

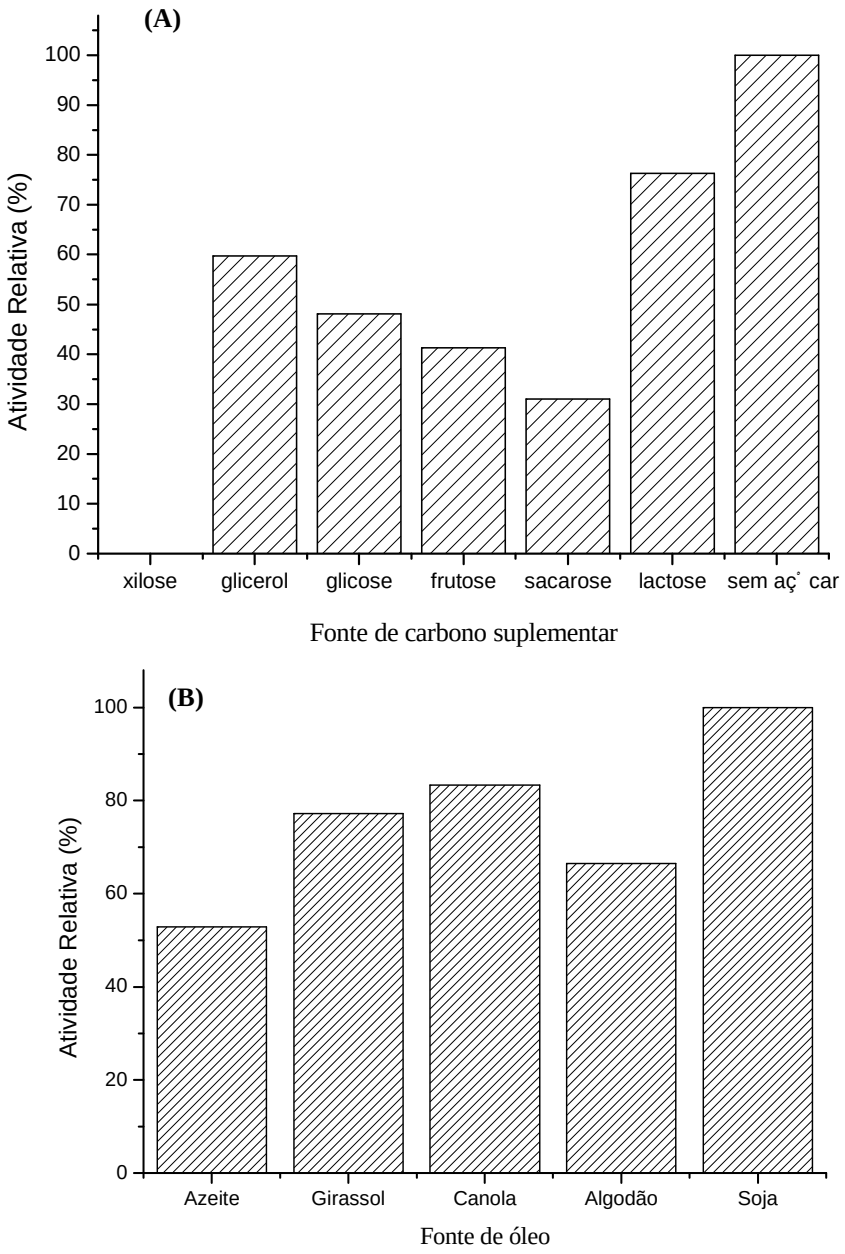


Figura 3. Efeito da composição dos meios de cultura sobre a produção de lipase *Thermomucor indicae-seudaticae* N31: **(A)** Fonte de carbono suplementar; **(B)** Tipos de óleo.

Também foi testado o volume de solução nutriente adicionada aos sacos fermetadores, esse fator influencia na umidade do substrato sólido desse tipo de processo fermentativo. Foi usada a solução nutriente descrita em 3.3.1 contendo 10 $g.L^{-1}$ de NH_4Cl, 20 $mL.L^{-1}$ de óleo de soja, e variou-se o volume de 15 a 30 mL (figura 4). A maior produção de lipase ocorreu usando-se 25 mL de solução nutriente garantindo 70% de umidade.

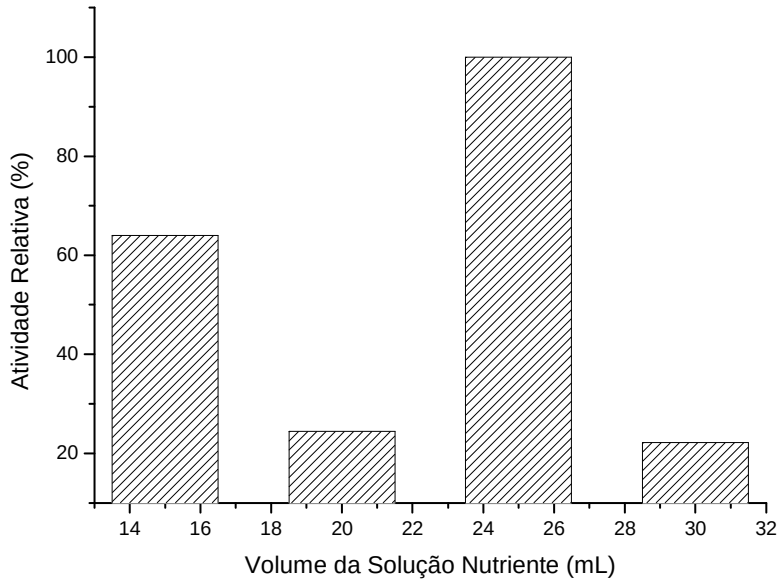


Figura 4. Efeito do Volume da solução nutriente sobre a produção de lipase *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

A extração da enzima foi feita utilizando-se vários tipos de soluções, água destilada, tampão fosfato pH7 0,05M e algumas concentrações de solução contendo triton X-100 (1, 5 e 10 $g.L^{-1}$) (figura 4A). Os tipos de solução na extração afetam a quantidade de enzima, pois as enzimas produzidas durante a fermentação podem se manter adsorvidas nas fibras do substrato. A maior atividade de enzima foi observada com a solução contendo 5,0 $g.L^{-1}$ triton X-100, entretanto, não houve diferença significativa na atividade quando foi utilizada essa solução e a água (95% de atividade relativa). O volume dessa solução também foi variado, de 40 a 60 mL, apresentando maior atividade de lipase com 50 mL de solução de 5,0 $g.L^{-1}$ triton X-100 (figura 4B).

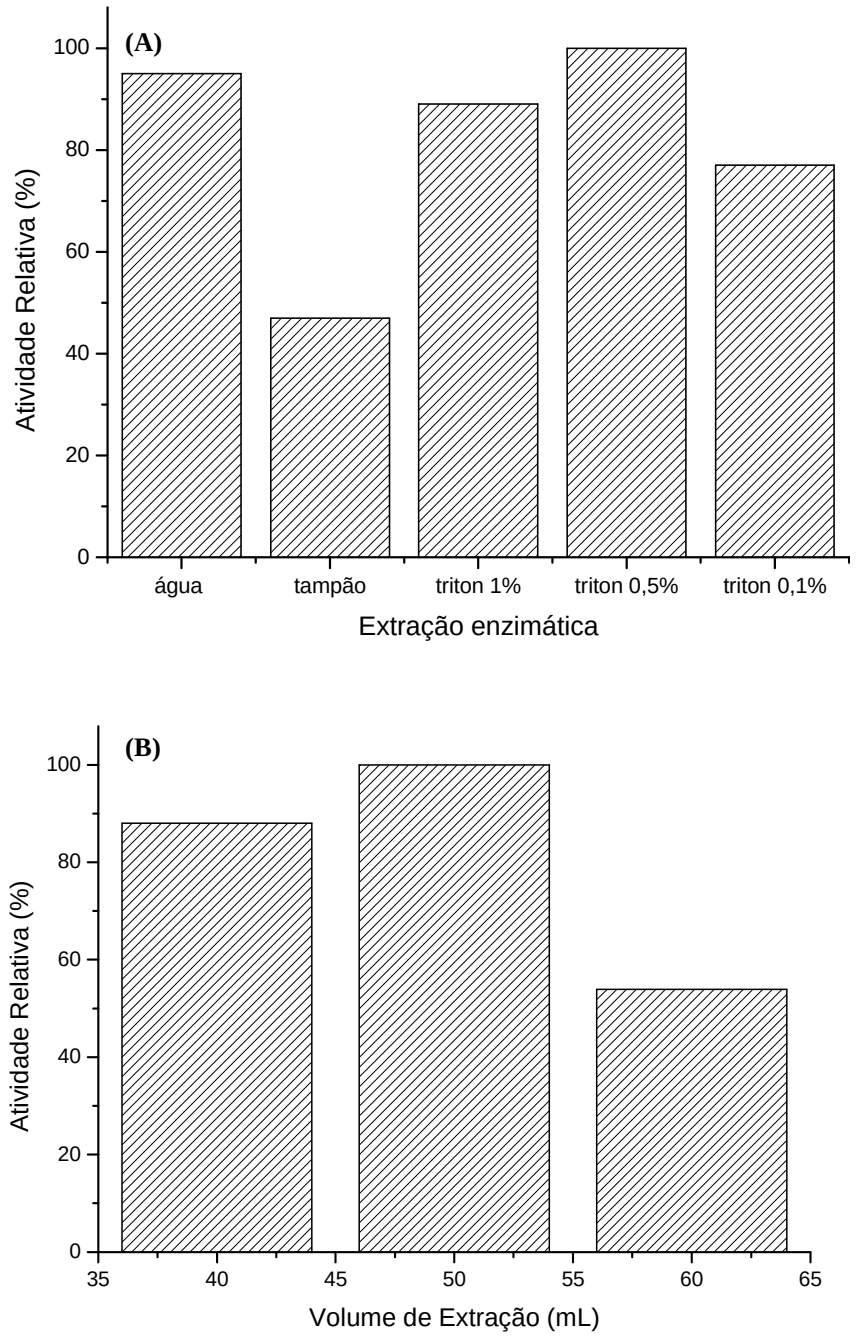


Figura 5. Efeito da composição e de algumas condições físico-químicas na produção de lipase por FES pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31: **(A)** solução de extração (água destilada; tampão fosfato de sódio 0,02M pH 7; 1, 5 e 10 $g.L^{-1}$ triton X-100). **(B)** volume da solução de extração (mL).

A temperatura do processo fermentativo também foi testada e variou-se de 40-50 ºC (Figura 5). Observou-se que a maior produção de enzima ocorreu a 45ºC, temperatura usual para o cultivo de fungos termofílicos. A atividade inicial da lipase produzida por esse fungo foi de 0,29 U/g em 24h, após o estudo realizado aumentou para 10,58 U/g em 24h.

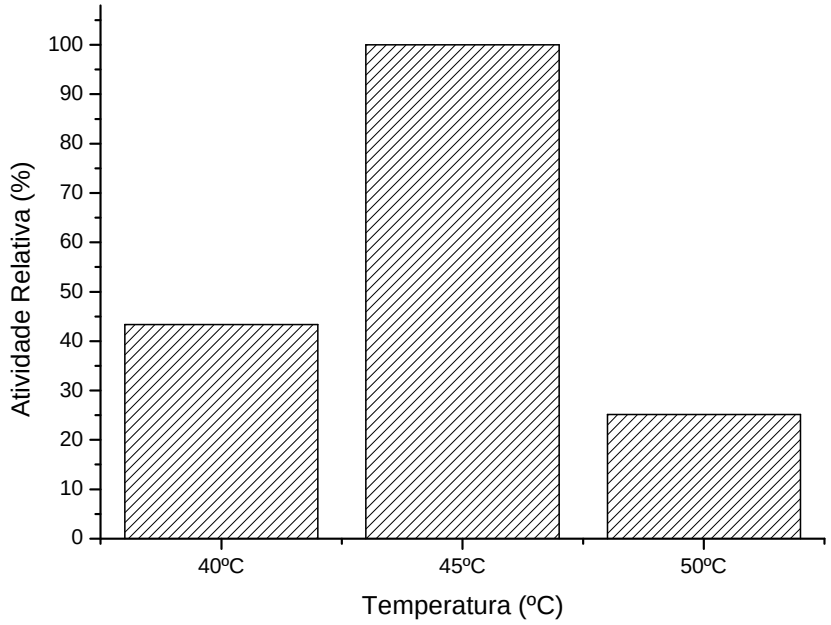


Figura 6. Efeito da temperatura sobre produção de lipase por FES pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

R. pusillus apresentou um comportamento um pouco diferente quando comparado com o *T. indicae-seudaticae* N31. Na escolha do substrato sólido, não houve diferença significativa entre o bagaço de cana-de-açúcar e o farelo de trigo (figura 7A), porém optou-se por utilizar o farelo de trigo nos testes seguintes. Essa linhagem também apresentou maior produção de enzima quando foi inoculado $5x10^5$ esporos (figura 7B).

Para a avaliação da suplementação com fonte de nitrogênio e açúcar, como fonte de carbono, utilizou-se a solução descrita em 3.3.1 com 20,0 $g.L^{-1}$ de cada composto testado. Ocorreu um maior rendimento na produção da enzima utilizando-se extrato de levedura como composto nitrogenado (figura 8A) e xilose como fonte de carbono (figura 8B).

A proporção entre esses suplementos também foi testada, fazendo-se combinações de 10 a 30 $g.L^{-1}$ de cada composto. A melhor concentração encontrada para produção de lipase por esse fungo foi de 20,0 $g.L^{-1}$ de nitrogênio para 20 $g.L^{-1}$ de açúcar (2:2) (Figura 9).

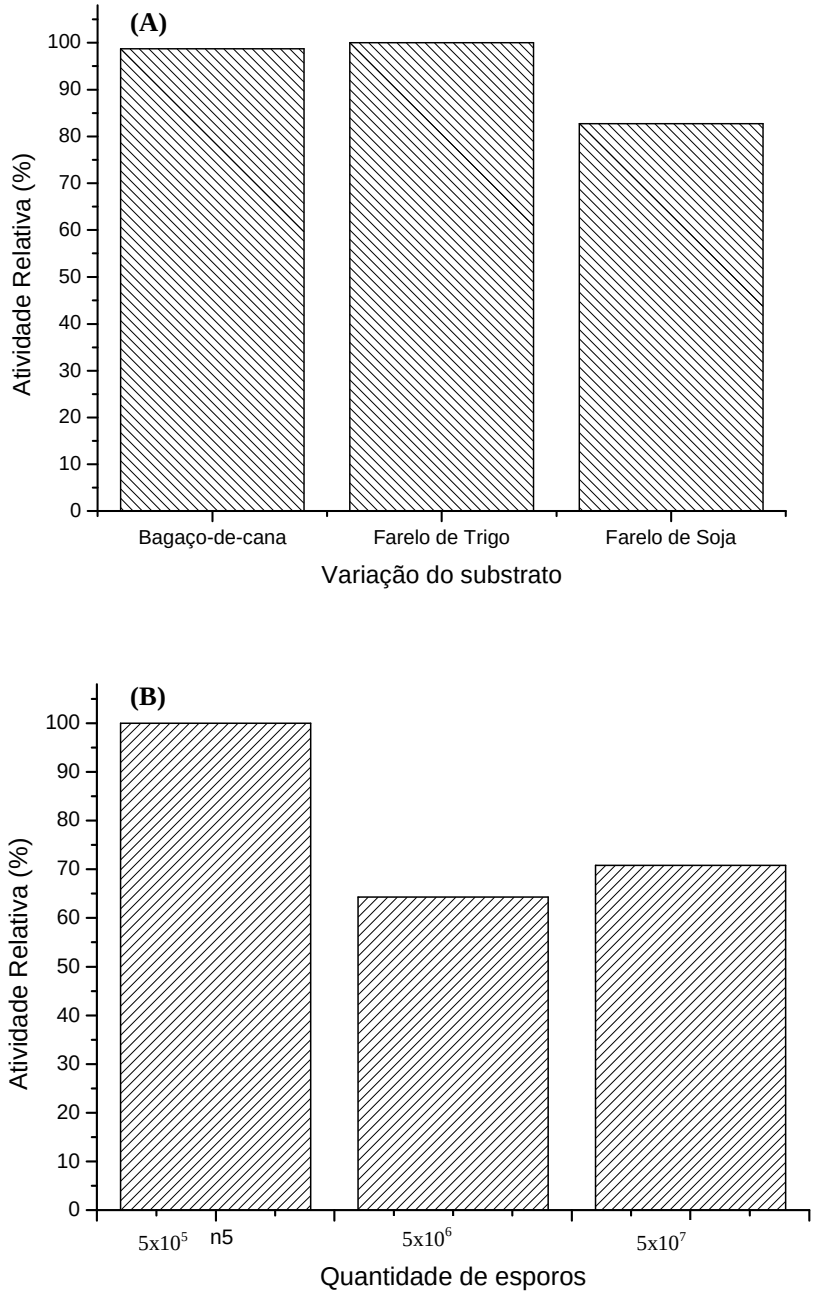


Figura 7. Efeito da suplementação do meio de cultivo e da quantidade de inoculo sobre a produção de lipase por *Rhizomucor pusillus*: **(A)** substrato sólido; **(B)** quantidade de esporos inoculado .

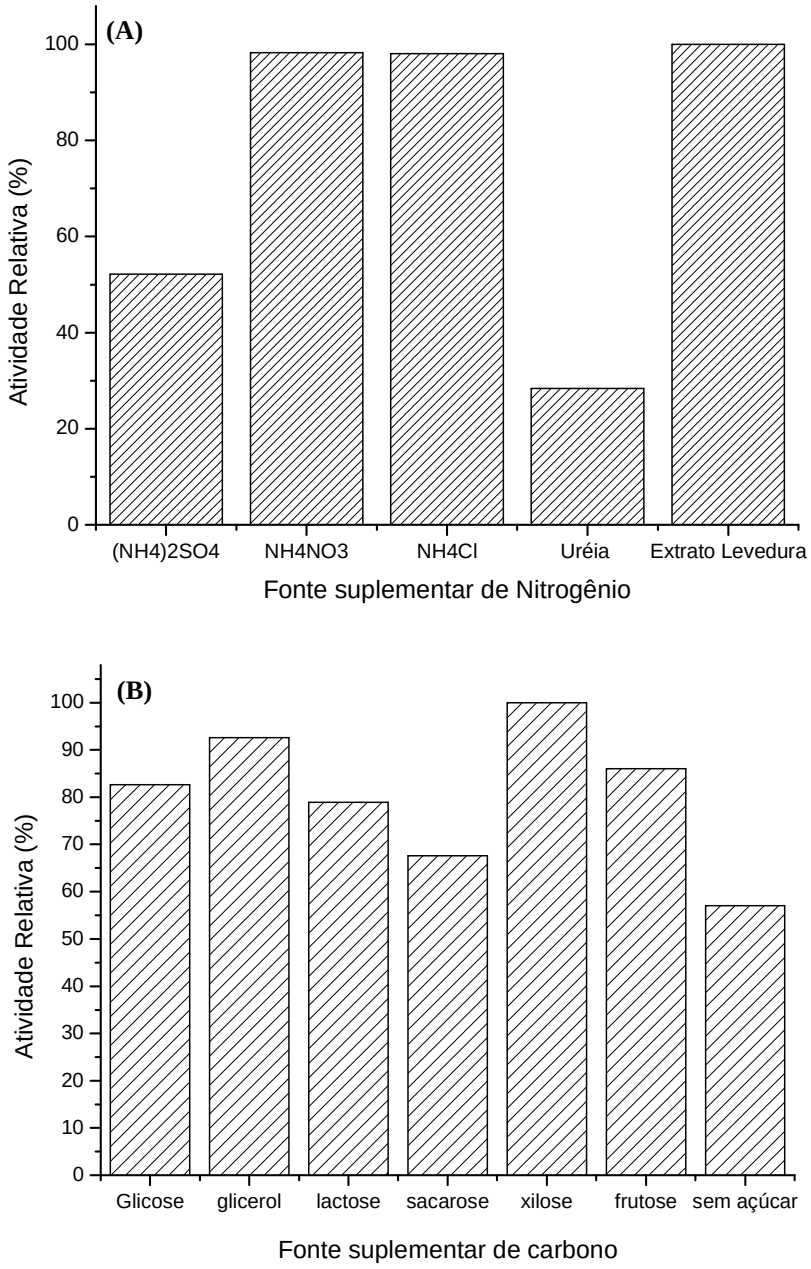


Figura 8. Efeito da suplementação do meio de cultivo sobre a produção de lipase por *Rhizomucor pusillus*: **(A)** Fonte suplementar de nitrogênio; (**B)** Fonte suplementar de carbono, utilizando-se açúcares.

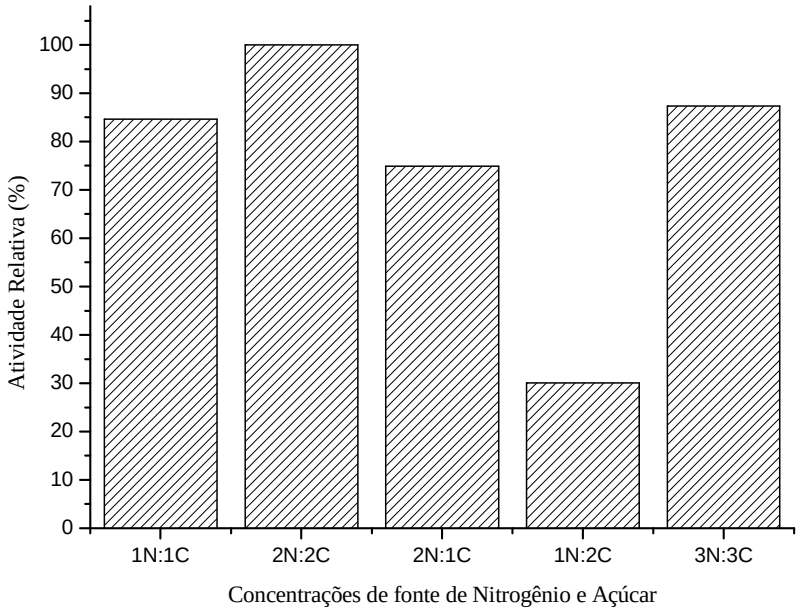


Figura 9. Efeito da suplementação do meio de cultivo sobre a produção de lipase por *Rhizomucor pusillus*: Concentração de fonte de nitrogêncio e açúcar.

A variação do tipo de óleo utilizado como fonte de carbono na produção da lipase por *R. pusillus* também foi avaliado. A produção da enzima foi maior na presença de óleo de canola seguido pelo óleo de girassol (80% de atividade relativa) (figura 10A). A solução nutriente suplementada que passou a ser utilizada foi composta por 20,0 $g.L^{-1}$ de peptona, 2,0 $g.L^{-1}$ de K_2HPO_4, 0,5 $g.L^{-1}$ de $MgSO_4$, 20,0 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura, 20,0 $g.L^{-1}$ de xilose e 20,0 $mL.L^{-1}$ de óleo de canola. Assim, variou-se de 5 a 20 mL, o volume da solução adicionada aos sacos fermentadores (figura 10B), sendo apresentado maior atividade de lipase quando se utilizou 10 mL de solução.

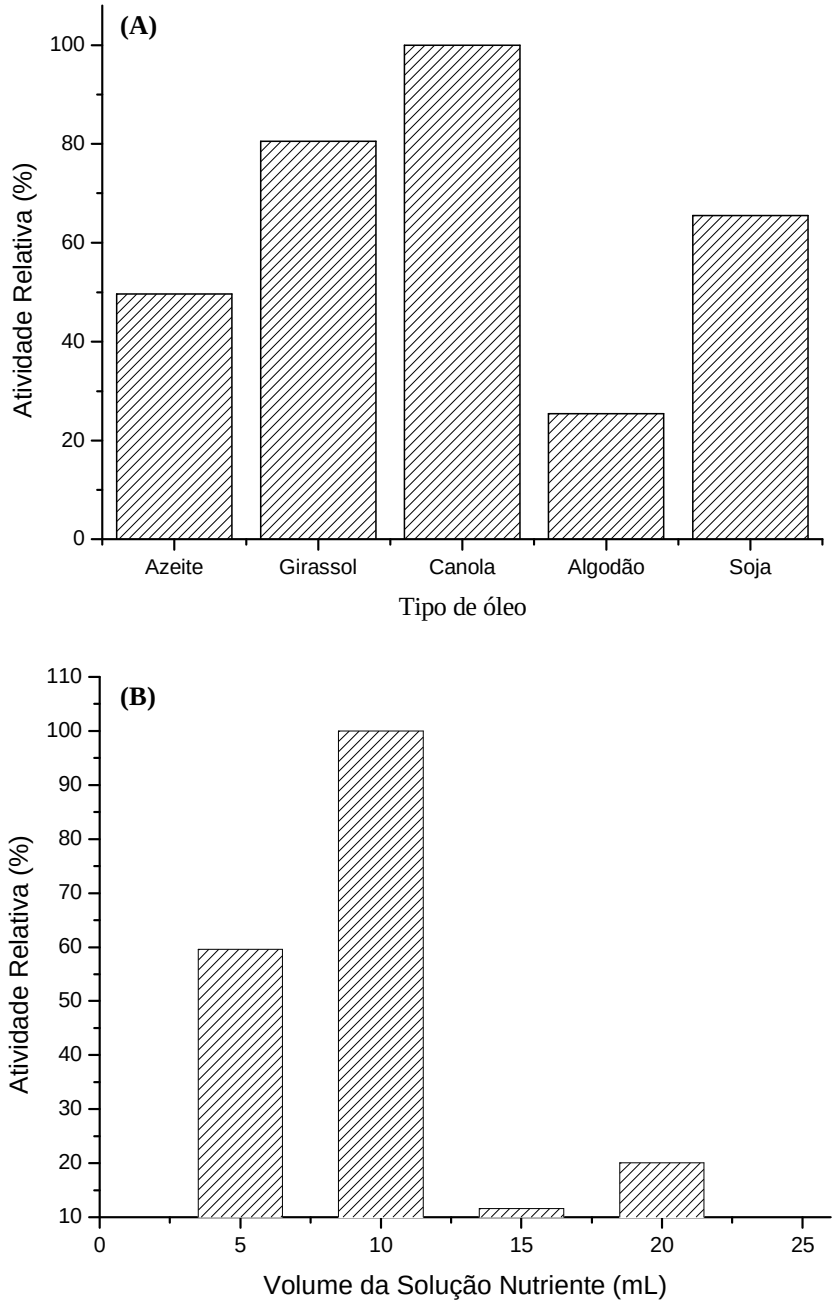


Figura 10. Efeito da suplementação do meio de cultivo sobre a produção de lipase por *Rhizomucor pusillus*: **(A)** Tipos de óleo; **(B)** Volume de solução nutriente.

Para essa linhagem também se avaliou os tipos de solução de extração. O maior valor de atividade foi encontrado na presença de solução extratora com 5 $g.L^{-1}$ de triton X-100, assim como o observado para a enzima de *T. indicae-seudaticae* N31 (figura 11A). No entanto, nota-se um aumento significativo para a extração com água (30 % de atividade relativa) em relação à extração com a solução de triton (100%), possivelmente o detergente auxilia na liberação das enzimas que estão mantidas por interações iônicas e hidrofóbicas na

parede celular do micro-organismo (NABARLATZ et al., 2010). O volume da solução de extração também foi testado (30-50 mL), sendo o melhor resultado obtido com usando-se 40 mL de solução contendo 5 $g.L^{-1}$ de triton X-100 na extração de enzimas (figura 11B).

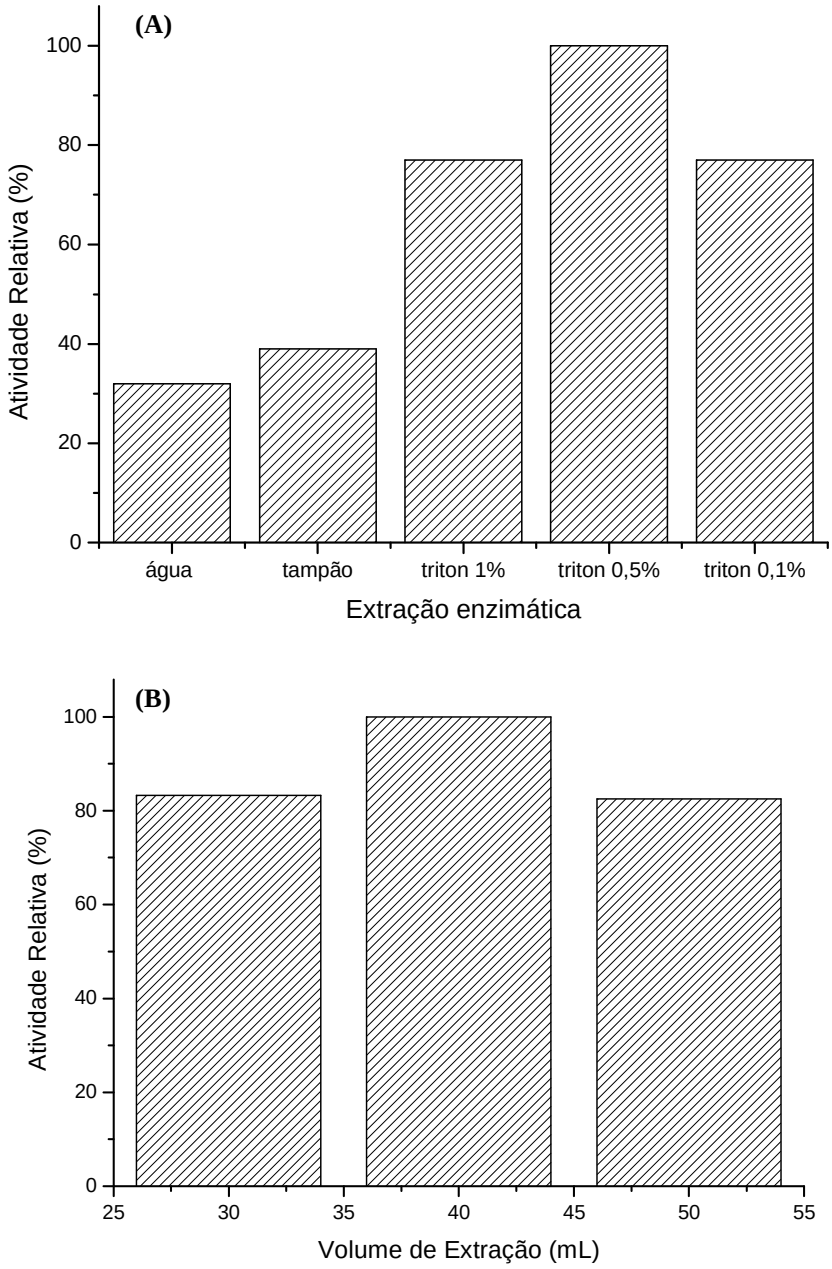


Figura 11. Efeito da suplementação do meio de cultivo sobre a produção de lipase por *Rhizomucor pusillus*: **(A)** Tipos de solução de extração; **(B)** Volume de solução de extração.

Ao se testar a temperatura da fermentação (45-50 ºC) observou-se maior produção de lipase em 40 ºC (figura 12). A produção da enzima inicial foi de 1,37 U/g (72h) após a suplementação do meio nutriente e o estudo das condições da produção de lipase pelo *R.*

pusillus, passou a produzir 21,54 U/g em 72h.

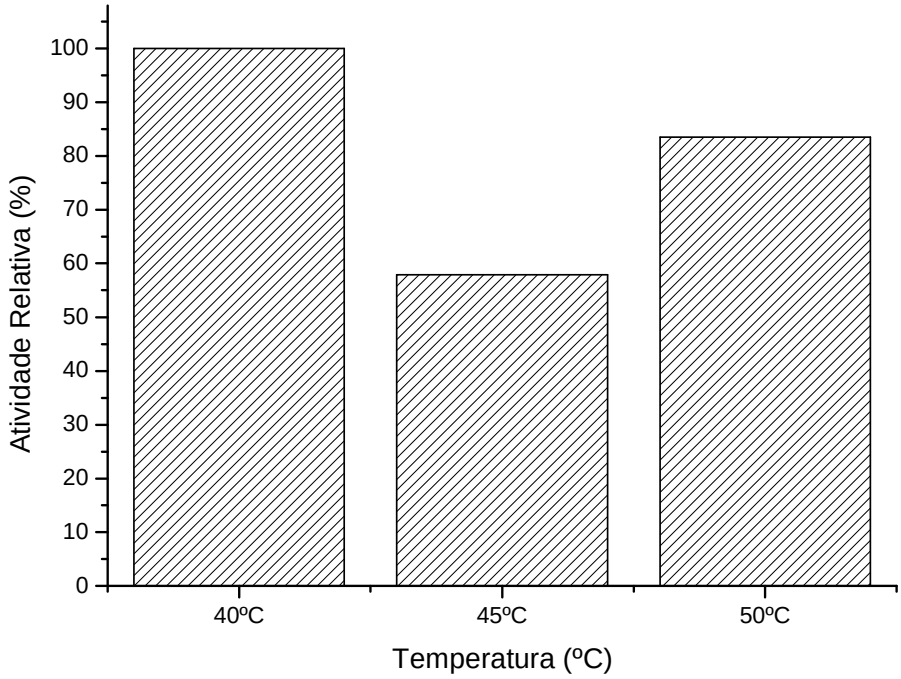


Figura 12. Efeito da temperatura sobre a produção de lipase por FES pelo *Rhizomucor pusillus*: (ºC).

Sun e Xu (2008) utilizaram vários produtos agro-industriais, como farinha de milho, farinha de trigo, farelo de trigo, aveia, arroz, farelo de arroz, cevada, soja em pó no processo de fermentação, e observaram os melhores resultados com a farinha de trigo, obtendo 1,5 U/g de atividade sintética de lipase de *Rhizopus chinensis*. Esse substrato possui alto conteúdo de nutrientes como fonte de carbono, importante para a produção de enzima. Outros autores também usaram farelo de trigo na produção de lipase (RIGO et al., 2010; MAHADIK et al., 2002, SIFOUR et al., 2010; NAGY et al., 2006).

Também foram testadas a suplementação com fontes de nitrogênio para *R. chinensis*, sendo que a peptona seguida pelo extrato de levedura levou ao maior valor de atividade de esterificação alcançada (SUN; XU, 2008). Para *Rhizopus homotallicus*, houve um aumento de seis vezes na atividade hidrolítica na presença de uréia (RODRIGUEZ et al., 2006). O mesmo foi observado para *Penicillium retrictum* (GOMBERT et al., 1999). Em *Penicillium aurantiogriseum* a produção foi estimulada usando sulfato de amônio (LIMA et al., 2003).

Gulatti et al. (1999) não observou melhoria na produção de lipase por *Aspergillus terreus* utilizando açúcares e alcoóis, e houve uma diminuição significativa na produção da

enzima na presença de xilose, maltose e lactose. Alguns autores estudaram a regulação da expressão da lipase, e sugeriram haver vários tipos de regulação, a regulação da expressão constitutiva e a regulação da expressão ativada pela presença de alguns indutores no meio. No entanto, observaram que a presença de glicose não foi vista como um indutor, pois a expressão da enzima foi diminuída em relação ao observado quando se induziu a produção de lipase adicionando-se óleo de oliva no meio de cultivo (LOTTI et al., 1998). Entretanto, Mahadik e colaboradores (2002) observaram melhor produção de lipase por *Aspergillus niger* na presença de glicose e óleo de oliva simultaneamente, e sugeriram esse aumento pela rápida assimilação da glicose, pois representa uma fonte de carbono de fácil metabolização quando comparadas aos lipídeos produzindo mais biomassa e maior atividade lipolítica. Essa diferença de comportamento indica a individualidade de cada organismo, podendo haver diferenças significativas na expressão de proteínas e no metabolismo e fisiologia do micro-organismo.

A suplementação usando bagaço de cana-de-açúcar e uréia melhorou a produção de lipase por *Pseudomonas aeruginosa*, aumentando seis vezes o rendimento da enzima do que com o meio suplementado com extrato de levedura (MAHANTA et al., 2008; RIGO et al., 2010). A utilização de bagaço de cana-açúcar suplementado com óleo de oliva foram considerados eficientes na produção de lipase obtendo-se uma produção de 79,6 U/g e 20,2 U/g pelos fungos *Rhizopus rhizopodiformis* e *Rhizomucor pusillus* (CORDOVA et al., 1998). Sun e Xu (2008) conseguiram um aumento de 15 vezes no rendimento da produção de lipase, otimizando o uso de componentes nutricionais e de fatores físicos.

O efeito da composição do meio e das condições experimentais da FES neste trabalho resultaram em um aumento de 1,37 para 21,54 U/g em 72h de produção pelo *R. pusillus*, ou seja, um aumento na produção de aproximadamente 16 vezes. Para *T. indicae-seudaticae* N31 os valores da atividade mudaram de 0,27 para 10,58 U/g em 24h, o que significa um aumento de 36 vezes na produção da enzima. Dados que corroboram a importância da suplementação de nutrientes na produção de lipase.

O óleo de oliva acarretou um aumento na produção de lipase de *R. chinensis* (SUN; XU, 2008). O mesmo resultado foi relatado para a produção de lipase por *R. hotallicus* e por *Aspergillus niger* (MAHADIK et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 2006). Rigo et al. (2010) observou que o óleo de soja não foi considerado um importante indutor de produção de lipase pelo *Penicillium* P58, em desacordo com o que geralmente é relatado na literatura.

O ácido linoléico e oléico são os dois ácidos graxos presentes em maior proporção nos óleos, o óleo de canola é constituído por 59% de ácido oléico. Têm-se observado que as

maiores produções de lipase estão correlacionadas com maior conteúdo de ácido oléico no óleo. Estando em acordo com os dados obtidos para o *R. pusillus*, ao qual produziu maiores quantidades de lipase na presença de óleo de canola. *T. indicae-seudaticae* N31 mostrou preferência para o óleo de soja, apresentando 44-62% de ácido linoléico (LIMA et al., 2003).

Outros autores também obtiveram sucesso na utilização de Triton X-100 na extração enzimática: Rodriguez et al (2006) usou uma solução de Triton X-100 a 1% para a extração da lipase de *Rhizopus homotallicus* e Mahadik et al. (2002) usou Triton X-100 0,5% associado a uma solução salina a 1% (NaCl) para a extração de enzima de *Aspergillus niger*.

Comparando o estudo da FES e FSm para a linhagem *T. indicae-seudaticae* N31, podemos observar uma diferença entre as melhores condições encontradas. Na FES foi obtido melhores resultados na ausência de açúcar, enquanto que na FSm a presença de 0,5% de glicose apresentou maiores valores de atividade. Em ambos processos de fermentação a presença de óleo de soja estimulou a produção enzimática. Rigo et al. (2010) encontrou diferença de comportamento pelo *Penicillium* P58 em relação aos vários suplementos testados, e sugeriu haver produção de diferentes enzimas. O mesmo pode ser sugerido para as enzimas produzidas pelo *T. indicae-seudaticae* N31, provavelmente os diferentes processos de fermentação utilizada podem ter estimulado a produção de diferentes lipases.

Os dados apresentados neste trabalho e os relatados na literatura mostram a importância de se estudar as condições do processo fermentativo para cada micro-organismo, já que cada linhagem estudada apresentou um perfil diferente. Pode-se concluir que o estudo do processo fermentativo geralmente eleva a produção de lipase. Esse aumento do rendimento pode ser fundamental para a realização de algumas aplicações.

4.3 Precipitação e SDS-PAGE

As lipases produzidas pelo *T. indicae-seudaticae* N31 em FES foram submetidas à uma precipitação e analisadas em eletroforese SDS-PAGE. A tabela 2 mostra os dados de precipitação com etanol e acetona do extrato bruto enzimático de *T. indicae-seudaticae* N31 produzido por FES, 75% de etanol e 80% de acetona apresentaram a melhor combinação entre maior rendimento e o melhor fator de purificação, &8,84 e 3,49% para etanol e 1,89 e 91,39% respectivamente. No segundo caso, apesar do altíssimo rendimento, o fator de purificação foi muito baixo. Mas podemos ressaltar que em especial para essa condição, não houve perda de atividade pela enzima na presença de 80% do solvente. A enzima proveniente da FES se mostrou mais tolerante aos solventes orgânicos testados que a originada da FSm, analisadas no capítulo anterior. Essa característica é relevante para algumas aplicações industriais.

Tabela 2. Precipitação do extrato bruto da lipase de *T. indicae-seudaticae* N31 produzida por FES.

Precipitação	Proteina Total (mg)	Atividade Lipolitica Total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
Etanol					
Extrato Bruto	2,00	1,03	0,52	1,00	100
50%	0,86	0,85	0,99	1,91	82,47
67%	0,43	0,62	1,46	2,81	60,16
75%	0,45	0,82	1,80	3,49	78,84
80%	0,37	0,40	1,15	2,22	40,88
Acetona					
Extrato Bruto	2,00	1,03	0,52	1,00	100
50 %	0,86	0,71	0,82	1,58	68,90
67%	0,43	0,58	0,96	1,85	55,77
75%	0,45	0,70	0,86	1,66	68,14
80%	0,37	0,95	0,98	1,89	91,39

Além das análises de proteína e atividade, as amostras fracionadas foram submetidas a um zimograma SDS-PAGE, no qual foi corado com corante específico de esterase (α–β-naphtyl na presença de fast blue).

A figura 13 mostra o Zimograma das amostras precipitadas da lipase produzida por FES. Pode-se observar que as enzimas precipitadas com acetona se mostraram mais concentradas (frações de 6 a 9) e pode-se sugerir a presença de duas lipases diferentes nesse extrato. Lipase de *Penicillium camembertti* também foi separada por métodos de purificação em duas formas (enzima A e B), sendo a mesma massa molar e sequência N-terminal idêntica observada para as duas enzimas (YAMAGUCHI, MASE, 1991). Várias isoenzimas também foram encontradas em: *Ustilago maydis* ATCC 14826 (Lipase I e II) (LANG et al., 1991), *Geotrichum candidum* ATCC 66592 (Lipase I e II) (VEERARAGAVAN et al, 1990), *Rhizopus delemar* (Lipase A, B e C) (TAHOUN, ALI, 1986) e *Rhizomucor miehei* (Lipase A e B) (HUGE-JENSEN et al., 1987). Essas análises são importantes para o conhecimento das enzimas em questão e para melhor direcionamento de futuras aplicações.

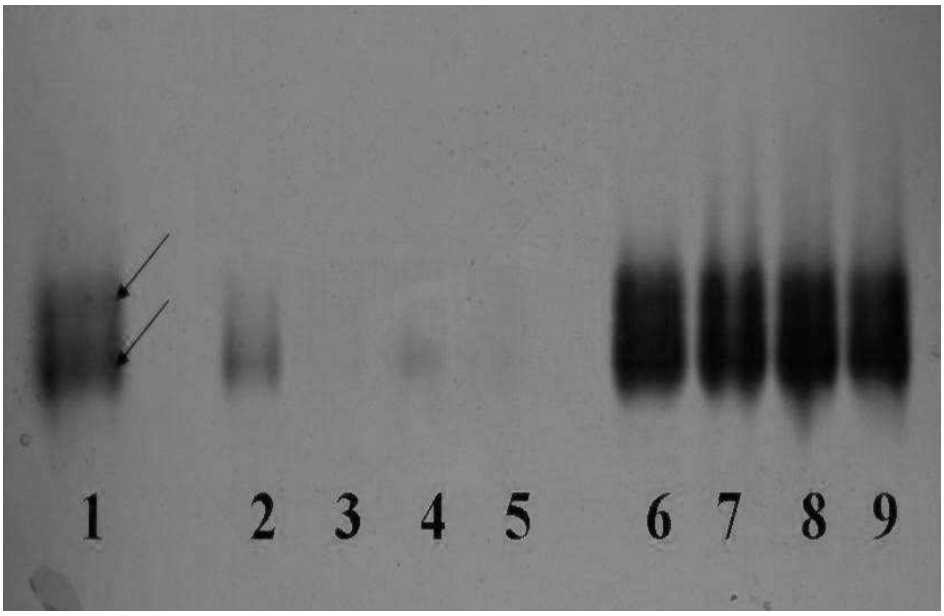


Figura 13. Zimograma (poliacrilamida 15%) das amostras precipitadas com etanol e acetona produzidas por FES coradas corado com corante específico α–β-naphtyl na presença de fast blue: (1) Extrato bruto; (2-5) precipitações com etanol; (6-9) precipitações com acetona.

III.5 CONCLUSÃO

Podemos considerar que a seleção de fungos termofílicos apresentados nos capítulos 2 e 3 foi positiva, pois foi feito um levantamento entre os fungos termofílicos da coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, sendo que as linhagens produtoras de lipase encontradas poderão ser aproveitadas em projetos futuros. Além disso, conclui-se que a FES foi mais efetiva na seleção dessas cepas, pois conseguimos um maior número de linhagens produtoras e que apresentaram maiores atividades após estudos mais detalhados.

Neste capítulo fica clara a individualidade de cada micro-organismo, pois as duas linhagens estudadas apresentaram fatores diferentes que influenciaram na produção enzimática. Para *R. pusillus*, o extrato de levedura, a xilose e o óleo de canola foram as composições que mais influenciaram na produção da enzima, tendo-se obtido sucesso na suplementação já que houve um aumento de 16 vezes rendimento lipolítico. Na produção de lipase por *T. indicae-seudaticae* N31 a ausência de glicose, cloreto de amônio e o óleo de soja são as composições que elevaram a produção da enzima 36 vezes. Concluímos então, que o estudo da composição do meio e dos fatores experimentais são extremamente importantes

para a produção de lipase, e que essas análises devem ser feitas para cada micro-organismo que será submetido a produção da enzima. No entanto, devemos ressaltar que a escolha do método a ser utilizado também deve ser levada em consideração, avaliando-se os dois processos ao qual foi submetido o *T. indicae-seudaticae* N31, e tendo-se obtido diferentes respostas nos diferentes processos de fermentação.

O fracionamento dos extratos enzimáticos produzidos em FSm e FES pelo *T. indicae-seudaticae* N31, indicaram razoável fator de purificação, bons rendimentos, e tolerância a etanol e acetona em especial para a enzima produzida por FES. A análise eletroforética sugere a possível existência de duas enzimas produzidas pelo mesmo fungo em FES. Essas análises são importantes a título de conhecimento das enzimas para melhor direcionamento das aplicações a que poderão ser submetidas.

III.6 REFERÊNCIAS

BANERJEE, M. Lipase Production by *Hansenula anomala* var. Schnegii, **Journal of Food Science and Technology**, v. 22, p.137-139, 1985.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye bindind. **Analitical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Químca Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CASTRO-OCHOA, L .D. et al. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR 11. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 648-654, 2005.

CORDOVA, J. et al. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 5, p. 75-78, 1998.

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

COSTAS, M. et al. Lipolytic activity in submerged cultures of *Issatchenkia orientalis*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2109-2114, 2004.

EDWINOLIVER, N. G. et al. Scale up of a novel tri-substrate fermentation for enhanced production of *Aspergillus niger* lipase for tallow hydrolysis. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 6791-6796, 2010.

FADILOGLU, S.; ERKMEN, O. Lipase production by *Rhyzopus oryzae* growing on different carbon and nitrogen sources. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p.1936-1938, 1999.

FUCIÑOS, P. et al. Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* B27: Partial purification and preliminary biochemical characterization. **Journal of Biotechnology**, v. 117, p. 233-241, 2005.

GOMBERT, A.K. et al. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a solid state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 85-90, 1999.

GULATTI, R. et al. Parametric optimization of Aspergillus terreus lipase production and its potetcial in ester synthesis. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 459-454, 1999.

HUGE-JENSEN, B. et al. Partial purification and characterization of free and immobilized lipases from *Mucor miehei*. **Lipids**, v. 22, p. 559–565, 1987.

KRIEGER, N. **Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum***. Curitiba. 1995. 260 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

LANG, S. et al. *Ustilago maydis* lipolytic enzymes: characterization and partial purification. In: _____. (Eds.). **Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering.** 1991. GBF Monographs. VCH, Weinheim, pp. 361– 364.

LIMA, V. M. G. et al. Effect of nitrogen and carbon souces on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 105-110, 2003.

LIMA, V. M.G. et al. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 31, p. 53-61, 2004.

LOTTI, M. et al. Physiological control on the espression and secretion of *Candida rugosa* lipase. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 143-148, 1998.

MAHADIK, N. D. et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.

MAHANTA, N. et al. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using Jatropha curcas seed cake as substrate, **Bioresource Tecnhology**, v. 99, p. 1729-1735, 2008.

NABARLATZ, D.; VONDRYSOVA, J.; JENICEK, P.; STÜBER, F.; FONT, J.; FORTUNY, A.; FABREGAA, A.; BENGOA, C. Hydrolytic enzymes in activated sludge: Extraction of protease and lipase by stirring and ultrasonication. **Ultrasonics Sonochemistry v.** 17 p. 923–931. 2010.

NAGY, V. et al. Kinetics resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 141-148, 2006.

NOVOTNY, C. The Production of Lipases by Some *Candida* and *Yarrowia* yeasts, **Journal of Basic Microbiology**, v. 28, p. 221-227, 1988.

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

PEREIRA-MEIRELLES, F.V. A Stable Lipase from *Candida lipolytica*: Cultivation Conditions and Crude Enzyme Characteristics. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63-65, p. 73-85, 1997.

RIGO, E. et al. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements, **Food Science and Technoogy**, v. 43, p. 1132-1137, 2010.

RODRIGUEZ, J.A. et al. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2264-2269, 2006.

SHARMA, R. et al. Production, purification, characterization, and applications of lipases**.** **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SIFOUR, M. et al. Enhanced production of lipase by the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5 using statistical experimental designs, **New Biotechnology**, (DOI: 10.1016/j.nbt.2010.04.004) in press 2010.

SUN, Y. S.; XU, Y. Solid state fermentation for “whole-cell synthetic lipase” production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 219-224, 2008.

TAHOUN, M.K., ALI, H.A. Specificity and glyceride synthesis by mycelial lipases of *Rhizopus delemar*. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 8, p. 429– 432, 1986.

TURKI, S. et al. Isolation of bioactive peptides from tryptone that modulate lipase production in *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2724-2731, 2009.

VEERARAGAVAN, K. et al. Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. **Biochimica at Biophysica Acta**, v. 1044, p. 26– 33, 1990.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by Serratia marcescens. **The Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

YAMAGUCHI, S., MASE, T. Purification and characterization of mono- and diacylglycerol lipase isolated from *Penicillium camembertii* U-150. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 720– 725, 1991.

CAPÍTULO IV:
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE LIPASES PRODUZIDAS POR *Thermomucor indicae-seudaticae* N31

IV.1 INTRODUÇÃO

A espécie *Thermomucor indicae-seudaticae* pertence ao filo Zygomycota, classe Zygomycetes, ordem Mucorales, família Mucoraceae e gênero *Thermomucor*. Os zigomicetos caracterizam-se por apresentarem a parede celular constituída por quitina e quitosana e micélio geralmente cenocítico, com septos apenas na delimitação dos órgãos de reprodução, ou quando a colônia envelhece.

A reprodução assexuada é forma reprodutiva mais comum utilizada por esse micro-organismo. Ocorre com a diferenciação de esporos imóveis, que são formados em diferentes estruturas, chamadas esporângios. Ainda pode ocorrer a partir de fragmentos de micélio, pois os fungos são altamente capazes de regeneração, bem como a formação de gemas ou clamidósporos, que correspondem a segmentos do micélio. A reprodução sexuada ocorre quando dois micélios geneticamente compatíveis se colocam lado a lado, uma vez que a maioria das espécies desse grupo de fungos é heterotálica.

O gênero *Thermomucor* representa fungos filamentosos geralmente encontrados em solo e vegetação em decomposição e possui apenas uma espécie descrita, a *T. indicae-seudaticae*. Essa espécie é termofílica, podendo crescer em temperatura de até 54°C. *T. indicae-seudaticae* foi primeiramente descrito *Mucor indicae-seudaticae* (SCHIPPER et al., 1975). Mais tarde, foi denominado *Thermomucor indicae-seudaticae* (SUBRAHAMANYAM et al., 1977).

Micro-organismos que vivem em condições adversas possuem alto potencial biotecnológico, pois suas enzimas possuem características diferenciadas de grande interesse da indústria. Em geral, há uma correlação alta entre a termofilia do organismo e a termoestabilidade de suas proteínas (intra e extracelulares) (BRUINS et al., 2001).

As enzimas termoestáveis vêm conquistando o seu espaço rapidamente. Portanto, os biocatalisadores termofílicos apresentam um alto potencial de aplicação, pois podem ser aplicadas nas mesmas condições dos processos industriais sem necessidade de grandes adequações. Possuem muitas vantagens como: alta reatividade, maior estabilidade, maior rendimento do processo, baixa viscosidade e poucos problemas de contaminação (IMAMURA, KITAURA, 2000; HASAN et al., 2006).

As lipases (E.C.3.1.1.3) são enzimas com importante papel fisiológico e potencial biotecnológico. Estão envolvidas em vários estágios do metabolismo de lipídeos, na digestão de gorduras, absorção e metabolismos de lipoproteínas (BALASHEV et al., 2001). Essa enzima tem sido muito requisitada em diferentes aplicações, na síntese de biosurfactantes, fármacos, química fina e compostos flavonóides. Essas aplicações podem ser limitadas por

razões econômicas o que leva a busca de novas lipases com propriedades mais especializadas (ADAMCZAK, BEDNARSKI,2004).

Devido a sua importância, as pesquisas sobre lipases têm focado caracterização estrutural e bioquímica, elucidação do mecanismo de ação, cinética e clonagem dos genes das lipases (BORNSCHEUER, 2000). As lipases comerciais normalmente são obtidas de micro-organismo e são extracelulares. Muitas lipases são ativas em solvente orgânicos, condição em que catalisam reações de esterificação, transesterificação, acetilação regioseletiva de mentol e glicol, síntese de peptídeos e outros compostos químicos (SHARMA et al., 2001).

Lipases microbianas são muito diversificadas quanto as suas propriedades enzimáticas e especificidade de substrato, por isso são muito requisitadas na aplicação industrial (HASAN et al., 2006). Assim, é de grande importância a realização de estudos de caracterização bioquímica, como avaliação de temperatura e pH ótimos e suas respectivas estabilidades, e por meio do comportamento que a enzima apresenta nessas análises pode-se direciona-las à aplicação que melhor se encaixe ao seu perfil.

IV.2 OBJETIVOS

Estudar as características bioquímicas de lipases produzidas por um linhagem termofílica selencionada nos capítulos 2 e 3, por meio de processos fermentativos em estado sólido e submerso.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar algumas características bioquímicas das lipases de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 produzidas por FSm e FES.
- Avaliar os efeitos de pH e temperatura sobre a atividade e estabilidade da enzima.

IV.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção de lipases

As lipases do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 estudados no capítulo 1 e 2 foram selecionadas para a caracterização bioquímica.

3.2 Meios de cultura

Para o cultivo das linhagens fúngicas testadas foi utilizado um meio nutriente modificado de Castro-Ochoa et al. (2005) contendo (%): 0,1 peptona; 1 $(NH_4)_2SO_4$; 1

KH_2PO_4; 0,05 $MgSO_4.7H_2O$; 0,1 $CaCl_2$; 2,5 óleo de soja; 0,8 de emulsificante (Tween 80); 0,5 de solução de elementos traços (2,2% de Zn $SO_4.7H_2O$; 1,1% de H_3BO_3; 0,5% de $MnCl_2.4H_2O$; 0,5% de $FeSO_4.7H_2O$; 0,16% de $CoCl_2.5H_2O$; 0,16% de $CuSO_4.5H_2O$; 0,11% de $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$; 5% de EDTA) e mantendo-se pH 6,0. Para os meios sólidos acrescentou-se 3% de ágar (a porcentagem maior de ágar que a usual de 2% serve para diminuir a fluidez do meio a temperaturas altas).

3.3 Fermentação Submersa (FSm)

Algumas das lipases extracelulares foram produzidas em fermentação submersa, no qual, o processo de fermentação foi realizado em erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio nutriente estéril descrito (3.2) acrescentado de 5% de óleo de soja, 0,8% de Tween 80 (emulsificante) e 0,1% de glicose (para algumas linhagens). Esse meio foi inoculado com 4 mL de suspensão de micélio ou esporos fúngicos, incubado 45º C sob agitação de 100 rpm por até 360 h. A cada período de 24 h de fermentação o material de um erlenmeyer foi filtrado a vácuo utilizando-se papel de filtro Whatman nº 1 e centrifugado. O sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta extracelular. A massa micelial foi mantida a 60°C até peso seco constante, para avaliação do crescimento microbiano.

3.4 Fermentação em estado sólido (FES)

A FES foi realizada em sacos de polipropileno (26,5 cm x 15 cm) contendo 10g de substrato. O inóculo foi obtido a partir do cultivo dos fungos por 3 dias em meio Sabouraud. O inóculo foi feito com a adição de 25 mL de solução nutriente aos sacos para a obtenção de uma umidade de 70%. Essa umidade foi obtida a partir da análise de peso seco dos substratos. A FES foi incubada a 45ºC por 72h. As amostras foram extraídas com 100 mL de água destilada. Em cada saco foi adicionado 5g de bagaço de cana-de-açúcar como suporte e o inoculo foi feito com uma solução nutriente contendo: 2% peptona; 0,2% K_2HPO_4; 0,05% $MgSO_4$; 2% óleo oliva.

3.5 Quantificação da atividade de lipase por hidrólise de sustrato cromogênico

Este método de hidrólise foi proposto por Winkler e Stukmann (1979), sendo modificado conforme Krieger (1995). Utiliza o substrato sintético p-nitrofenil palmitato (*p*NPP) pela enzima, em meio aquoso contendo como surfactantes a goma arábica e o Triton X-100. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1 μmol de

*p*NP (*p*nitrofenol) por minuto. O coeficiente de extinção molar do *p*NP utilizado foi 8,03x10^{-3}M/L (LIMA et al., 2004).

Soluções Utilizadas:

- Solução A: *p*-nitrofenil palmitato em isopropanol, em uma concentração de 3 mg/mL.
- Solução B: 2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica, em 450 mL tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0.

A 9 mL da solução A foram misturados 1 mL da solução A, lentamente e sob contínua agitação. A reação foi incubada a uma temperatura de 45 °C por 1 minuto, e a absorção foi lida em espectrofotômetro a 410 nm.

3.6 Efeito da Temperatura e pH ótimos

O ensaio enzimático foi realizado variando-se a temperatura em 20 a 55ºC, em tampão padrão do ensaio (pH 7), para se verificar a temperatura ótima de atuação da enzima bruta. Também se variou o pH de 3 a 10, incubados à temperatura padrão do ensaio (45ºC), para a obtenção do pH ótimo da atividade da lipase bruta. A metodologia utilizada foi a descrita em 3.5.

3.7 Efeito da Estabilidade em pH e Temperatura

A lipase foi incubada de 1 a 24h variando-se a temperatura em 20 a 55ºC, em tampão padrão do ensaio (pH 7), para se verificar a estabilidade em temperatura. A enzima foi incubada à Temperatura ambiente (25ºC) por 1 a 24h variando-se o pH em 3 a 10, para a estabilidade em pH a metodologia utilizada foi a descrita em 3.5.

IV.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização bioquímica das lipases do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 produzidas por FSm e FES

A figura 1 mostra a produção de lipase por *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em dois processos fermentativos diferentes, fermentação submersa (FSm) e fermentação em estado sólido (FES). Em FSm dois picos foram observados, 144 e 240h, com 3,30 e 6,00 U/mL de atividade, respectivamente. Em FES, um pico foi observado após 24 horas de produção com 3,04 U/g de atividade hidrolítica de lipase.

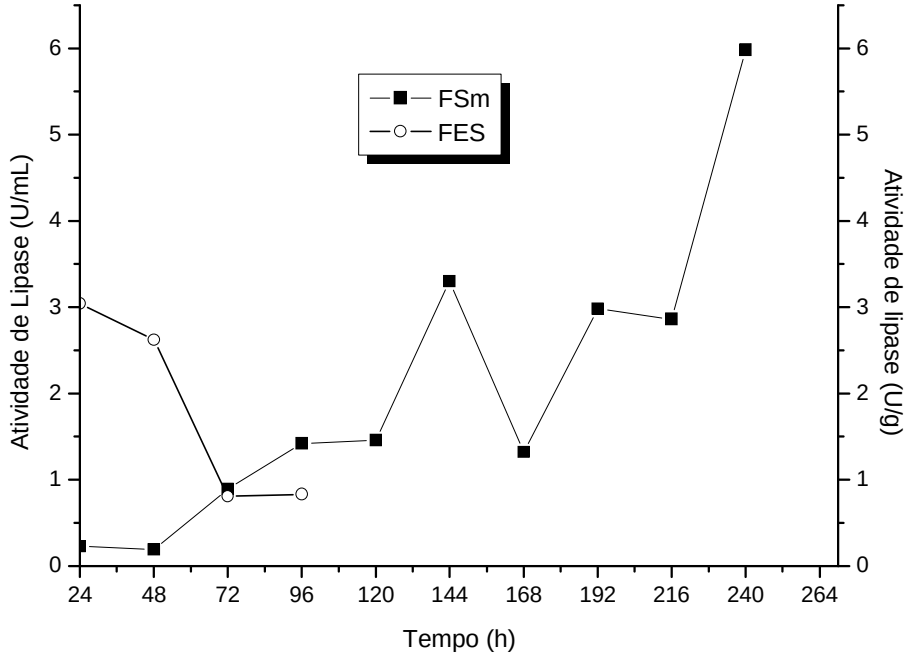


Figura 1. Produção de lipase pelo *T. indicae-seudaticae* N31 em fermentação em estado sólido (o) e fermentação submersa (■). A atividade foi medida pelo método espectrofotométrico utilizando-se p-NPP como substrato.

Na figura 2, observa-se que para lipase produzida por *T. indicae-seudaticae* N31 em FSm, a atividade máxima foi nos pHs 6 e 7. E para a enzima produzida em FES atividade máxima foi nos pHs 3 e 4. A temperatura ótima da lipase foi em 40ºC nos dois casos (figura 3).

Os resultados da lipase em FSm estão de acordo com os dados relatados para as enzimas intracelulares de *Rhizomucor miehei* e *Yarrowia lipolytica* (ADAMCZAK, BEDNARSKI, 2004), e enzima extracelular de *Pseudozyma hubeiensis* (BUSSAMARA et al., 2010). Mateos-Diaz et al. (2006) observou atividades máximas para *Rhizopus homotallicus* a pH 7,5, o mesmo foi encontrado para *Cryptococcus* sp (KAMINI et al., 2000). A lipase do basidimiceto *Bjerkandera adusta* apresentou atividade máxima em pH 7 (BANCERZ, R.; GINALKA, G., 2007).

Pastore e colaboradores (2003) estudaram as características bioquímicas do extrato lipolítico bruto de uma nova linhagem de *Rhizopus* sp, e observaram atividade ótima em uma faixa de pH 6-6,5 e em temperatura de 40ºC. Estudos realizados com *R. homothallicus* em fermentação submersa e fermentação sólida, mostraram que ambas lipases produzidas obtiveram uma atividade máxima das enzimas puras em pH 7,5, no entanto, a atividade em função da temperatura variou entre 30-40ºC (MATEOS-DIAZ et al., 2006).

Lipases fúngicas tem apresentado atividade ótima nas temperatures de 30 a 40ºC, resultado observado para *R. homotallicus, Cryptococcus* sp, *Aureobasidium pullulans, R. miehei* and *Y. lipolytica* (ADAMCZAK; BEDNARSKI, 2004; KAMINI et al., 2000; MATEOS-DIAZ et al., 2006).

Mahadik et al. (2002) encontraram uma lipase ácida produzida por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido com o pH ótimo na faixa de 2,0 a 3,0. *Penicillium simplicissimum* também produziu lipase ácida em FES, sendo as maiores atividades observadas à 50ºC e pH 4 e 5. Quando se comparou com lipase pura produzida pelo mesmo fungo em FSm, o valor máximo de atividade máxima foi a 37ºC e pH 5. O autor observou que a lipase produzida em FES é mais termofílica do que a produzida em FSm, mas ambas são enzimas ácidas. (GUTARRA et al., 2009).

Semelhante ao encontrado nesse trabalho, provavelmente lípases diferentes foram produzidas tanto no trabalho de Gutarra et al (2009) quanto no presente trabalho. Neste caso, as temperaturas ótimas obtidas são iguais, mas, em FES podemos observar a produção de lipase ácida, enquanto que a lipase produzida em FSm foi neutra.

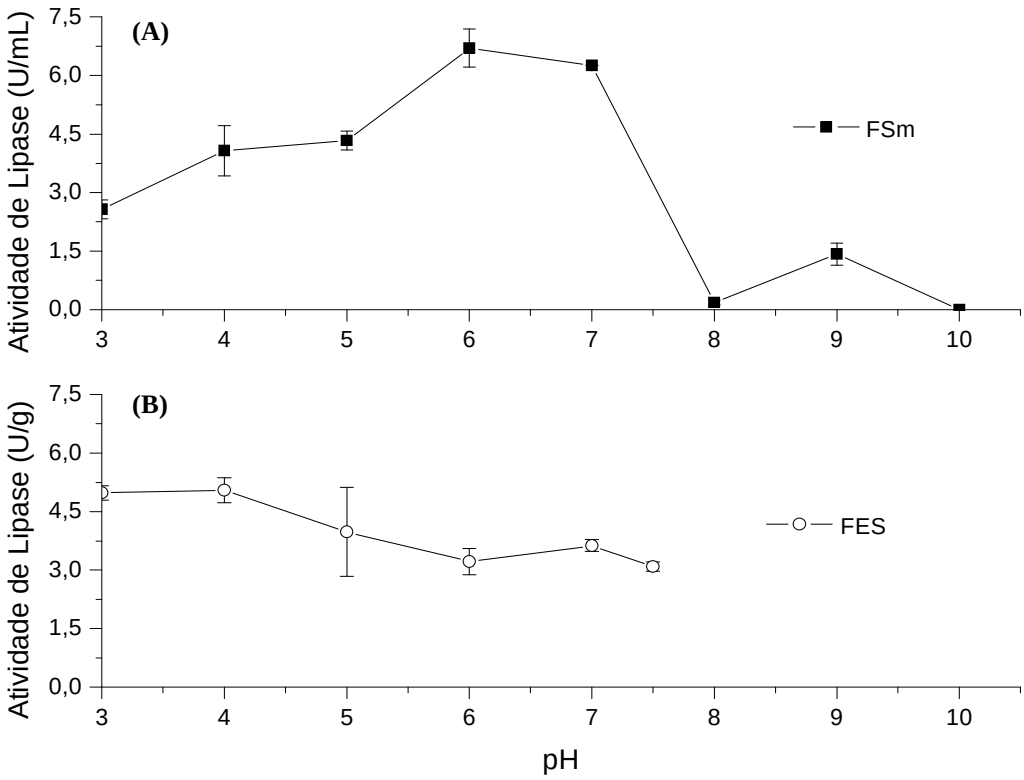


Figura 2. Efeito do pH na atividade da lipase de *T. indicae-seudaticae* N31 produzida em FSm e FES; **(A)** (■) FSm (U/ml); **(B)** (○) FES (U/g); A atividade foi medida pelo método espectrofotométrico utilizando-se p-NPP como substrato e o ensaio realizado a 40ºC.

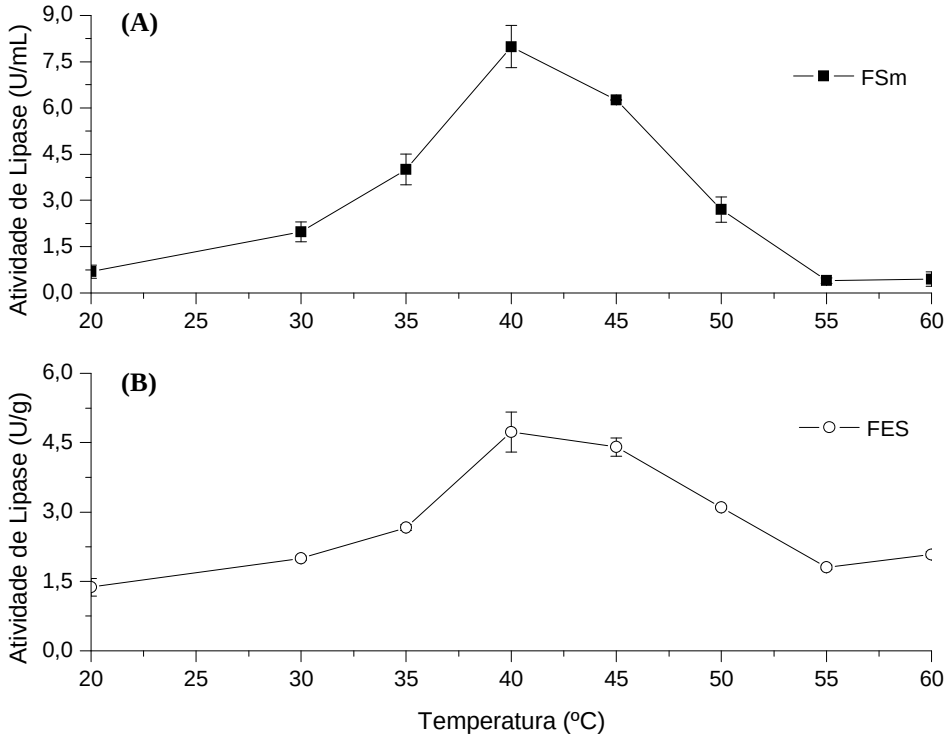


Figura 3. Efeito da Temperatura sobre a atividade da lipase de *T. indicae-seudaticae* N31 produzida em FSm e FES; **(A)** (■) FSm (U/ml); **(B)** (○) FES (U/g); A atividade foi medida pelo método espectrofotométrico utilizando-se p-NPP como substrato e o ensaio realizado em tampão fosfato de sódio 0,05M pH7.

A estabilidade térmica foi testada entre 20-60ºC em pH 7. A enzima produzida em FSm foi estável de 20 a 55ºC por 1 h com um aumento na atividade relativa de 15 a 110% (figura 4A). Depois de 24 h a enzima manteve 100% da atividade inicial entre 35 e 40ºC. Nas temperaturas de 50 e 55ºC apresentaram uma queda da atividade, mas ainda manteve-se cerca de 60% da atividade.

O pH de estabilidade foi analisado em uma faixa de pH 3 a 8 à 40ºC e a lipase de *T. indicae-seudaticae* N31 produzida por FSm mostrou uma ativação de 20 a 40% em valores de pH de 5 a 8 depois 1 h e após 24 horas mantiveram cerca de 100% de atividade residual e em pH 4 foi maior que 80% (Figura 4B).

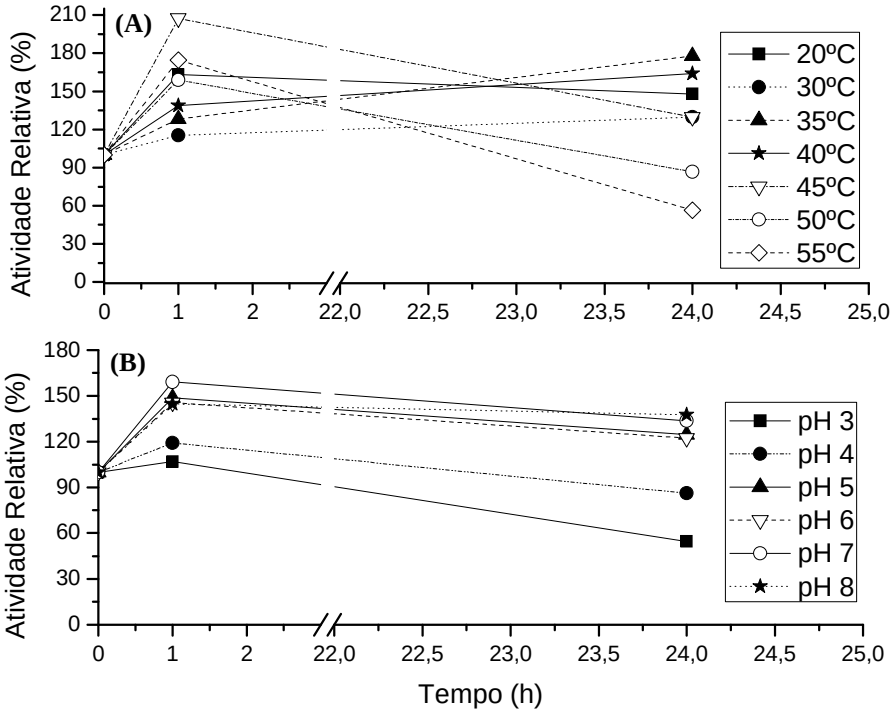


Figura 4. Efeito da temperatura **(A)** e do pH **(B)** sobre a estabilidade da lipase de *T. indicae-seudaticae* N31 produzida em fermentação submersa. A atividade foi medida pelo método espectrofotométrico utilizando-se p-NPP como substrato.

A lipase de *T. indicae-seudaticae* N31 produzida em FES não se mostrou termoestável como observado para a enzima produzida por FSm. Neste caso, após 1 hora de incubação nas temperaturas de 45-55ºC observou-se uma atividade residual menor que 70%. E após 24 horas houve uma queda abaixo de 70% para todas as temperaturas testadas (figura 5A).

Após a exposição à faixa de pH de 3-7,5, 80% de atividade foram mantidos em todos os pHs depois de 1 hora de incubação. Após 24 h, somente para o pH 3 houve uma queda na estabilidade, sendo a atividade residual por volta de 60% (Figura 5B).

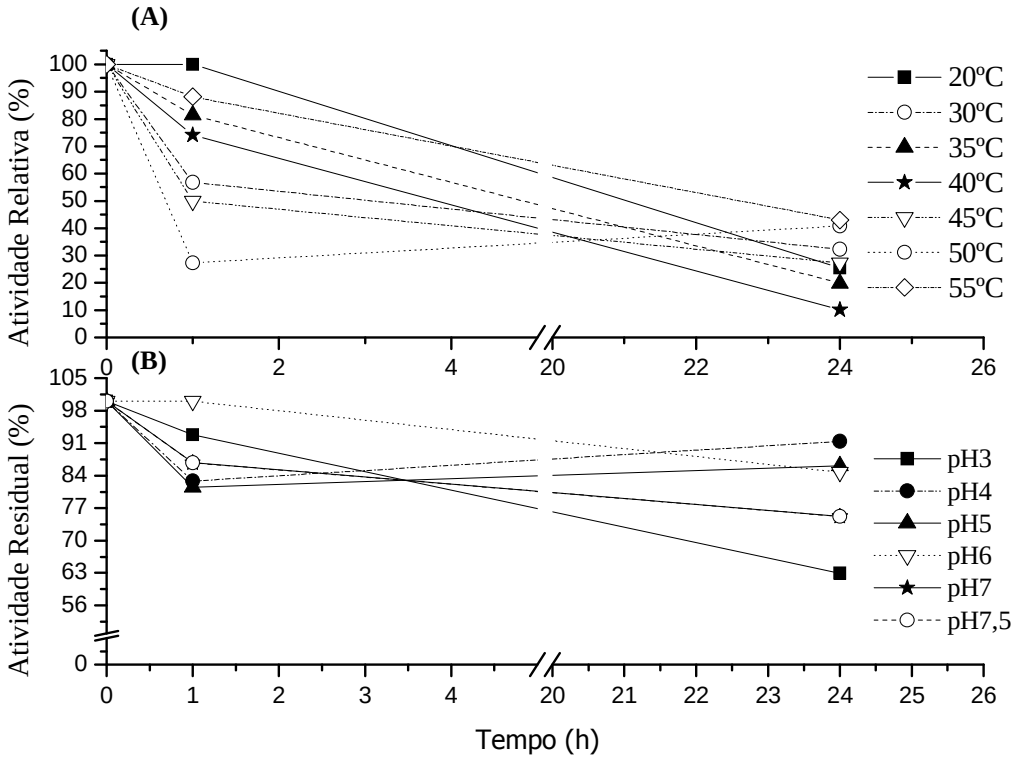


Figura 5. Efeito da temperatura **(A)** e do pH **(B)** sobre a estabilidade da lipase de *T. indicae-seudaticae* N31 produzida em fermentação em estado sólido. A atividade foi medida pelo método espectrofotométrico utilizando-se p-NPP como substrato.

A lipase de *B. thermoleovorans* foi considerada relativamente termoestável, pois se manteve a 75% de atividade entre 50-60ºC. A enzima de *Penicillium aurantiogriseum* apresentou temperatura ótima a 70ºC, mas depois 30 min de incubação, restaram somente 32% atividade residual a 50ºC e 45% a 45ºC (CASTRO-OCHOA et al., 2005; LIMA et al., 2004). Lipases de *Rhizopus Chinensis* apresentaram atividade residual maior que 80% após 1 h de incubação a 30-50ºC (SUN; XU, 2009), a lipase produzida por *R. homothallicus* obtiveram cerca de 50% da atividade residual depois de 43,2 min a 50ºC (KAMINI et al., 2000).

Gutarra et al. (2009) observaram que a lipase bruta de *P. simplicissimum* produzida em FES apresentou uma boa estabilidade térmica, 50% de atividade residual à 50ºC e sendo 20 vezes mais estável que a lipase pura produzida em FSm pelo mesmo fungo e 7 vezes mais estável que a lipase produzida em FES por *Rhizopus homothallicus* em estudo relatado por Mateos-Diaz et al. (2006). Neste trabalho podemos destacar que a lipase bruta produzida por *T. indicae-seudaticae* N31 em FSm foi quase 3 vezes mais estável (90% em 24h) que a enzima produzida em FES pelo mesmo fungo e quase duas vezes mais estável que a lipase estável relatada por Gutarra et al. (2009).

A lipase de *B. thermoleovorans* foi estável à uma ampla faixa de pH (5-11) retendo mais que 80% de atividade residual depois 26 h a 30ºC (CASTRO-OCHOA et al., 2005). Resultados similares foram observados em *P. aurantiogriseum* em uma faixa de pH de 5-9, aumentando cerca de 20% após incubação a valores de pH 6-8 (LIMA et al., 2004). Estabilidade entre os pHs 4-9 tem sido relatada para lipases de *Aspergillus terreus* e *Mucor hiemalis f. hiemalis, A. pullulans* (BANCERZ, GINALSKA, 2007).

As enzimas produzidas pelos dois processos de fermentação apresentaram diferenças. Apesar de apresentarem a mesma temperatura ótima, diferenças foram observadas para o pH ótimo e para as estabilidades estudadas. Os dados de estabilidade de pH mostraram que essa enzima pode ser tolerante a uma ampla faixa de pH (5-8) para as enzimas produzidas por FSm e por FES. A lipase produzida por FSm não apresentou desnaturação a altas temperaturas e provou ser termoestável, mas a produzida por FES se mostrou muito instável. De acordo com esses resultados, podemos dizer que diferentes enzimas foram produzidas pelos diferentes processos de fermentações corroborando os resultados observados no capítulo 2 e 3. Os interessantes resultados de estabilidade observada tornam essas enzimas aptas a serem estudadas em aplicações biotecnológicas.

IV.5 CONCLUSÃO

Ao compararmos as enzimas produzidas pelo mesmo fungo termofílico (*T. indicae-seudaticae* N31) em dois processos de fermentação diferentes, podemos sugerir que enzimas diferentes foram produzidas nesses processos. Apesar de a temperatura ótima ter sido a mesma e o pH de estabilidade ter variado em geral de 4-8 para ambas lipases, observamos diferenças significativas na avaliação da estabilidade sobre a temperatura e em relação ao pH ótimo. Em FSm foi encontrada uma enzima neutra (pH 6-7) e essa enzima foi termoestável quando comparamos aos resultados relatados na literatura. Em FES houve a produção de uma enzima ácida (pH 3-4), mas a lipase não se apresentou termoestável. A lipase produzida em FSm é uma potencial candidata a ser testada em aplicações industriais, já que enzimas termoestáveis são de grande importância na biotecnologia.

Esses estudos mostram a importância de se estudar as enzimas de interesse, o que facilita o direcionamento para as aplicações biotecnólogicas, o principal objetivo desse projeto e da maioria das pesquisas realizadas com as lipases.

IV.6 REFERÊNCIAS

ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Enhanced activity of intracellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles, **Process Biochemistry**, v. 39, p.1347-1361, 2004.

BALASHEV K. et al. Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces: Part I. Atomic force microscopy. **Biochimie**, v. 83, p. 387–397, 2001.

BANCERZ, R.; GINALSKA, G., A novel thermostable lipase from Basidiomycete *Bjerkandera adusta* R59: characterisation and esterification studies. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,** v. 34, p. 553-560, 2007.

BORNSCHEUER UT, editor. Enzymes in lipid modification. Weinheim: Wiley-VCH, 2000.

BRUINS, M. E.; JANSSEN, A. E. M.; BOOM, R. M. Thermozymes and their applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 90, p. 155-185, 2001.

BUSSAMARA, R. et al. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 268-275, 2010.

CASTRO-OCHOA, L .D.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R. O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR 11. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 648-654, 2005.

GUTARRA, M.L.E. et al. Production of an acidic and termostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5249-5254, 2009.

HASAN, F. et al. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251,2006.

IMAMURA S, KITAURA S. Purification and characterization of a monoacylglycserol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H-257. **J Biochem**, v. 127, p. 419–425, 2000.

KAMINI, N. R. et al. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp S-2, **Process Biochemistry,** v. 36, p. 317-324, 2000.

KRIEGER, N. **Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum***. Curitiba. 1995. 260 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

LIMA, V. M.G. et al. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 31, p. 53-61, 2004.

MAHADIK, N. D. et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.

MATEOS-DIAZ, J. C. et al. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures, **Enzyme Microbiology Technology**, v. 39, p.1042-1050, 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.

SCHIPPER, M. A. A.; SAMSON, R. A.; STALPERS, J. A. Zygospore ornamentation in the genera *Mucor* and *Zygorhynchus*. **Persoonia** v 8, p. 321-328.,1975

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

SUBRAHAMANYAM, A.; B.S.; MEHROTRA, B. S.; THIRUMALACHER, M. J. *Thermomucor* — a new genus of Mucorales. **Georgia Journal Science.,** v. 35, p. 1-4, 1977.

SUN, S. Y.; XU, Y. Membrane-bound 'synthetic lipase' specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by Rhizopus chinensis: A comparative investigation, **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1336-1342, 2009.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by Serratia marcescens. **The Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

CAPÍTULO V:
IMOBILIZAÇÃO DE HIFAS FÚNGICAS E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DO BIODIESEL

V.1 INTRODUÇÃO

As lipases catalisam tanto as reações de hidrólise quanto as de síntese de éster a partir de ácidos graxos de cadeia longa, conferindo a esse grupo de enzimas um grande potencial de aplicação. Lipases microbianas são amplamente diversificadas em suas propriedades e especificidade ampliando esse potencial de aplicação (BANCERZ, GINALSKA, 2007).

As lipases também apresentam atividade e estabilidade em sistemas não-aquosos, favorecendo as reações de esterificação e transesterificação, permitindo o uso em processos como o da produção de biodiesel (alquil ésteres) (VILLENEUVE et al., 2000). A utilização de enzimas imobilizadas nesse processo permite a redução de custos pela possibilidade de se reutilizar enzimas. Tem sido relatada a imobilização de lipase de várias fontes microbianas como *Candida antartica* (WANG et al., 2007; WATANABE et al, 2000), *Pseudomonas fluorescens* (ISO et al., 2001; SALIS et al. 2008), *Pseudomonas cepacia* (SALIS et al., 2005; SHAH, GUPTA, 2007), *Rhizomucor miehei* e *Chromobacterium viscosum* (SHAH et al., 2004; SHIEH et al., 2003).

Vários métodos vêm sendo utilizados na imobilização de lipases extracelulares: adsorção, ligação covalente, encapsulação e ligação cruzada. (TAN et al., 2010). Entretanto, a imobilização de lípases intracelulares é pouco utilizada devido às dificuldades de extração e purificação. Uma alternativa é a utilização da biomassa imobilizada. Estudos demonstram que lipases intracelulares ligadas às células secas podem ser aplicadas em reações de esterificação, transesterificação, hidrólise e acidólise (ADAMCZAK, BEDNARSKI, 2004).

Desse modo, a busca por novas formas de se utilizar a lipase imobilizada como biocatalisador vem ganhando espaço entre cientistas. Pois a imobilização pode ser uma forma promissora de diminuir os custos, permitindo reutilização da enzima e um maior rendimento do processo, fatos que tornam a lipase ou células imobilizadas biocatalisadores competitivos em relação aos químicos já utilizados. Assim, o objetivo do trabalho foi estudar linhagens com potencial de aplicação após a imobilização de suas células em bucha vegetal ou esponja de poliuretano.

V.2 OBJETIVOS

O objetivo geral dessa etapa do projeto foi imobilizar os fungos selecionados como os melhores produtores de lipase e testar seu potencial de catálise em reações de esterificação e transesterificação.

2.1 Objetivos específicos

- Imobilizar as hifas de *Myceliophthora* sp M7.7, *Myceliophthora* sp F2.1.3, *Myceliophthora* sp F2.1.1, Rhizomucor *pusillus, Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e *Thermomyces lanuginosus* TO-05 em bucha vegetal (*Luffa cyllindrica (L.) Roem.*) e em esponjas de poliuretano.
- Selecionar os imobilizados quanto ao potencial de esterificação.
- Testar as hifas selecionadas em ensaio de transesterificação, e avaliar o rendimento na produção de acil ésteres.

V.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura

Para o pré-inóculo das linhagens fúngicas e as fermentação foram utilizados o meio nutriente modificado de Castro-Ochoa et al. (2005) contendo ($g.L^{-1}$): 1,0 peptona; 10,0 $(NH_4)_2SO_4$; 10,0 KH_2PO_4; 0,5 $MgSO_4.7H_2O$; 1,0 $CaCl_2$; 25 óleo de soja; 8,0 de emulsificante (Tween 80); 5 de solução de elementos traços (22,0 Zn $SO_4.7H_2O$; 11,0 de H_3BO_3; 5,0 $MnCl_2.4H_2O$; 5,0 $FeSO_4.7H_2O$; 1,6 $CoCl_2.5H_2O$; 1,6 de $CuSO_4.5H_2O$; 1,1 $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$; 50,0 de EDTA) e corrigindo-se o pH para 6,0. Para os meios sólidos acrescentou-se 30,0 $g.L^{-1}$ de ágar (a porcentagem maior de ágar que a usual de 20,0 $g.L^{-1}$ serve para diminuir a fluidez do meio a temperaturas altas).

3.2 Fermentação semi-sólida e imobilização das hifas

O processo de fermentação foi realizado em erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio nutriente estéril (descrito em 3.1) acrescentado de 5% de óleo de soja, 0,8% de Tween 80 (emulsificante) e pedaços de bucha vegetal (*Luffa cyllindrica (L.) Roem.*) ou esponja de poliuretano. A bucha vegetal e a esponja foram cortadas em cubos de aproximadamente 1,5 e 1 cm^2 (figura 1), fervidas com água destilada e secas em estufa a 60ºC.

Foram pesadas cerca de 15 cubos de esponja ou bucha em cada erlenmeyer de 250 mL e foram autoclavados na presença do meio líquido. Incubados a 45ºC por até 120h sob 120 rpm de agitação.

A cada 24h foram extraídas as amostras. A extração foi feita por filtração à vácuo, sendo o sobrenadante separado para posteriores análises, as buchas foram então lavadas no filtro à vácuo com água destilada para a retirada de resíduos do meio de cultura e com

acetona, para retirada de excesso de óleo presente no meio. As buchas foram secas em estufa à vácuo a 35ºC, foram pesadas úmidas e secas para o cálculo da umidade e biomassa. Para o cálculo da biomassa foi subtraída a massa seca final (hifas imobilizadas secas) da massa seca inicial das buchas colocadas nos erlenmeyers antes das fermentações. Depois de secas, foram usadas para a determinação da atividade hidrolítica pelo método titulométrico (3.4).

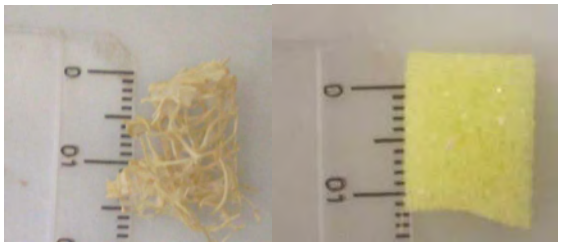


Figura 1. Cubo da bucha vegetal com aproximadamente 1,5 cm^2 e da esponja de poliuretano com aproximadamente 1 cm^2.

3.3 Quantificação da atividade de lipase hidrolítica por titulometria

Para a quantificação da atividade por hidrólise de óleos foi utilizada a titulometria. Em erlenmeyer de 50 mL, foram pesados 0,09g de goma arábica que foi dissolvida em 3 mL de água destilada e 4 mL de tampão fosfato 0,05M pH 7, 1 mL de óleo de oliva foram adicionados ao meio reacional. Foram incubadas à 45ºC por 30 min.

Após a incubação, a reação foi interrompida com acetona:álcool etílico (1:1) e titulada com KOH 0,05 M padronizado, usando fenolftaleína 0,001% como indicador ácido-base (SOARES et al., 1999).

Para cálculo da atividade:

$$A = \frac{(V_{KOH\ amostra} - V_{KOH\ controle}) x M x 1000}{m_{amostra} \times tempo}$$

Onde:

$V_{KOH\ amostra}$: volume de base titulada na amostra,

$V_{KOH\ controle}$: volume de base titulada no controle,

M: molaridade de KOH usada (0,05M),

$m_{amostra}$: massa seca da amostra usada na reação (g),
Tempo de incubação: 30 min.

A atividade é expressa em U/g, que é definida como quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de ácido graxo por minuto por grama de proteína, nas condições do ensaio.

3.4 Reação de Esterificação

O ensaio de esterificação foi realizado empregando-se a metodologia proposta por Langone et al. (1999) e Bernardes et al. (2007). Foi adicionado 0,6 g de hifa imobilizada aos substratos reacionais contendo uma proporção molar de 1:2 ácido oléico/etanol. A mistura foi incubada por 40 minutos a 40 °C sob agitação de 150 rpm. Após a incubação, foram retiradas alíquotas (triplicata) de 300 µL e a reação foi interrompida pela adição de 20 mL de uma solução de acetona/etanol 1:1 (v/v). Uma alíquota foi retirada e titulada antes da adição da enzima, sendo utilizado como branco. Os ácidos graxos não consumidos na reação foram titulados até pH 11,0 com solução de NaOH 0,02 N. As dosagens de atividade de esterificação de lipase foi definida como a quantidade de enzima necessária para consumir 1 µmol de ácido graxo por minuto por grama de proteína nas condições descritas, determinada por meio da Equação:

$$\text{Atividade de esterificação (U/mL)} = \frac{(Vb - Va).N.1000.Vt}{t.\ V_{al}.V_{am}}$$

Onde:

Va: volume de NaOH gasto na titulação da amostra

Vb: volume de NaOH gasto na titulação do branco

N: Normalidade da solução de NaOH padronizada

Vt: volume reacional total (5,6 mL)

t: tempo de reação (40 minutos)

V_{al}: volume da alíquota (0,3 mL)

V_{am}: volume de extrato enzimático equivalente á massa de extrato liofilizado

3.5 Reação de Transesterificação

Para o ensaio padrão de transesterificação foi utilizado óleo de canola, girassol e soja, e álcool etílico 99%, com razão molar 1:6 (óleo:álcool) e 10% de catalisador (enzima livre ou imobilizada) em relação ao meio reacional, totalizando-se 10g de meio, sob agitação de 150 rpm. A temperatura da reação foi de 45ºC, e foi utilizado hexano, a uma razão 1:1,5 (óleo:solvente) como solvente na reação. O tempo de incubação variou de 24 a 120 horas, e uma alíquota de 500 µl foi retirada a cada 24h e analisada por Cromatografia Gasosa (CG) (MOREIRA et al., 2007).

3.6 Análise dos ésteres por Cromatógrafia Gasosa (CG)

Para quantificação dos ésteres, 1 µl de cada amostra foi injetado em Cromatógrafo HP 5890 serie II, usando o software *Chromoleon*, a coluna utilizada foi FFAP (Ácido nitrotereftálico modificado por polietileno glicol). A temperatura da corrida foi de 180º a 225ºC, mantendo uma taxa de aquecimento 4ºC por minuto. As temperaturas do injetor e do detector (fit) foram de 250ºC, e o gás carreador utilizado foi o Nitrogênio (SHAH et al., 2006; TORRES, et al. 2007).

Uma curva de calibração (Tabela 1) foi feita utilizando ésteres com pureza acima de 98%, como o etil linoleato, etil linolenato, etil oleato, etil palmitato e etil estearato. O calculo de rendimento das reações de sínteses foram realizadas segundo proposto por Urioste et al. (2008). A figura 6A–apêndice ilustra o cromatograma com os padrões etílicos usados.

Tabela 1. Dados obtidos da curva de calibração.

Etil éster	*a*	*b*	*R*
PALMITATO	0,18	38,47	0,995
ESTEARATO	0,016	45,36	0,995
OLEATO	0,45	42,45	0,994
LINOLEATO	0,64	40,85	0,994
LINOLENATO	0,51	37,66	0,993

Para o cálculo do rendimento foi utilizada a seguinte equação:

$$R = \frac{Mt}{Me} .100 \qquad (A)$$

Onde Me é a massa teórica esperada, Mt é massa obtida dos ésteres, essa massa é calculada de acordo com a curva de calibração feita com os padrões (B):

$$y = a + b.x \qquad (B)$$

Onde y, é a área do pico do éster analisado, a e b são os dados obtidos da curva (Tabela 1) e x é a massa que será encontrada.

Para o cálculo do Me da equação A, foi necessário usar as seguintes equações:

$$Me = \frac{(Mo \,.\, MMe)}{MMa} \qquad (C)$$

$$Mo = Ca \,.\, Mi \qquad (D)$$

Onde Mo é a massa inicial dos ácidos graxos presente no óleo, MMa é a massa molecular de cada ácido graxo, MMe massa molecular de cada éster correspondente, Ca é a concentração (massa molar) de cada ácido graxo e Mi é a massa inicial de cada ácido graxo presente no óleo.

Pelas equações C e D, o Me e o Mo de cada ácido graxo foram cálculos e somados, para obtenção da massa teórica esperada do óleo, e aplicada na equação A, obtendo-se assim o rendimento em porcentagem.

V.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Imobilização das hifas fúngicas

Enzimas imobilizadas têm sido muito utilizadas na biocatálise. Fungos filamentosos produtores de lipase podem ser uma nova opção na utilização de imobilizados, podendo ser utilizadas células inteiras como biocatalisadores. A preparação desse tipo de biocatalisador é fácil e não é necessário nenhum processo de purificação, e as células imobilizadas podem ser usadas diretamente na reação. Seis fungos foram testados nesse tipo de imobilização: *Myceliophthora* sp M7.7, *Myceliophthora* sp F2.1.3, *Myceliophthora* sp F2.1.1, *Rhizomucor pusillus*, *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e *Thermomyces lanuginosus* TO-05. Os fungos foram imobilizados em esponja de poliuretano e bucha vegetal por fermentação submersa (figura 2 e 3).

As fermentações com a esponja de poliuretano não foram bem sucedidas. Como os poros são menores, podem ter dificultado o crescimento fúngico dentro delas. Desse modo,

curvas de fermentação foram feitas com todos os fungos imobilizados em bucha vegetal (figura 3).

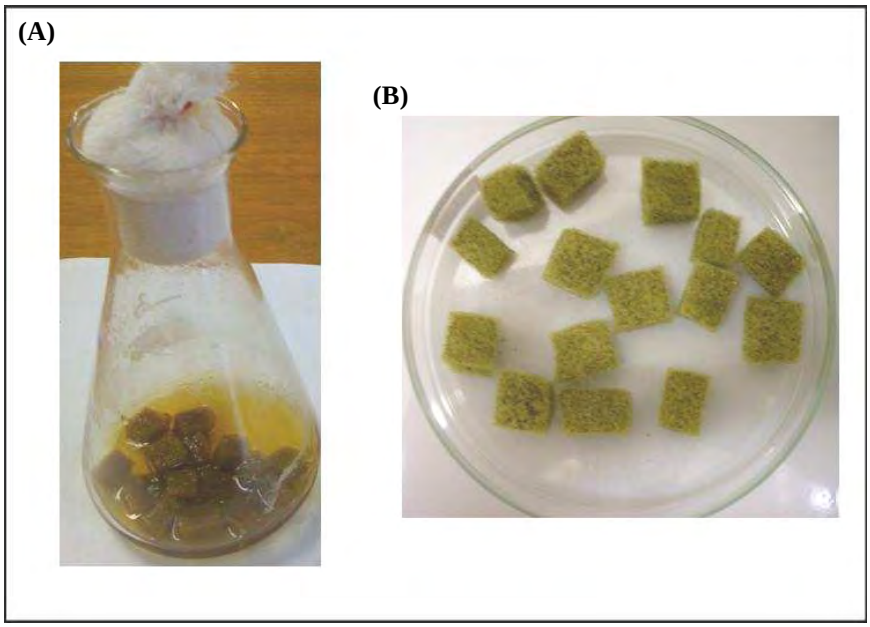


Figura 2. (A) Fermentação submersa com hifas imobilizadas; **(B)** *T. lanuginosus* TO-05 imobilizado na esponja de poliuretano.

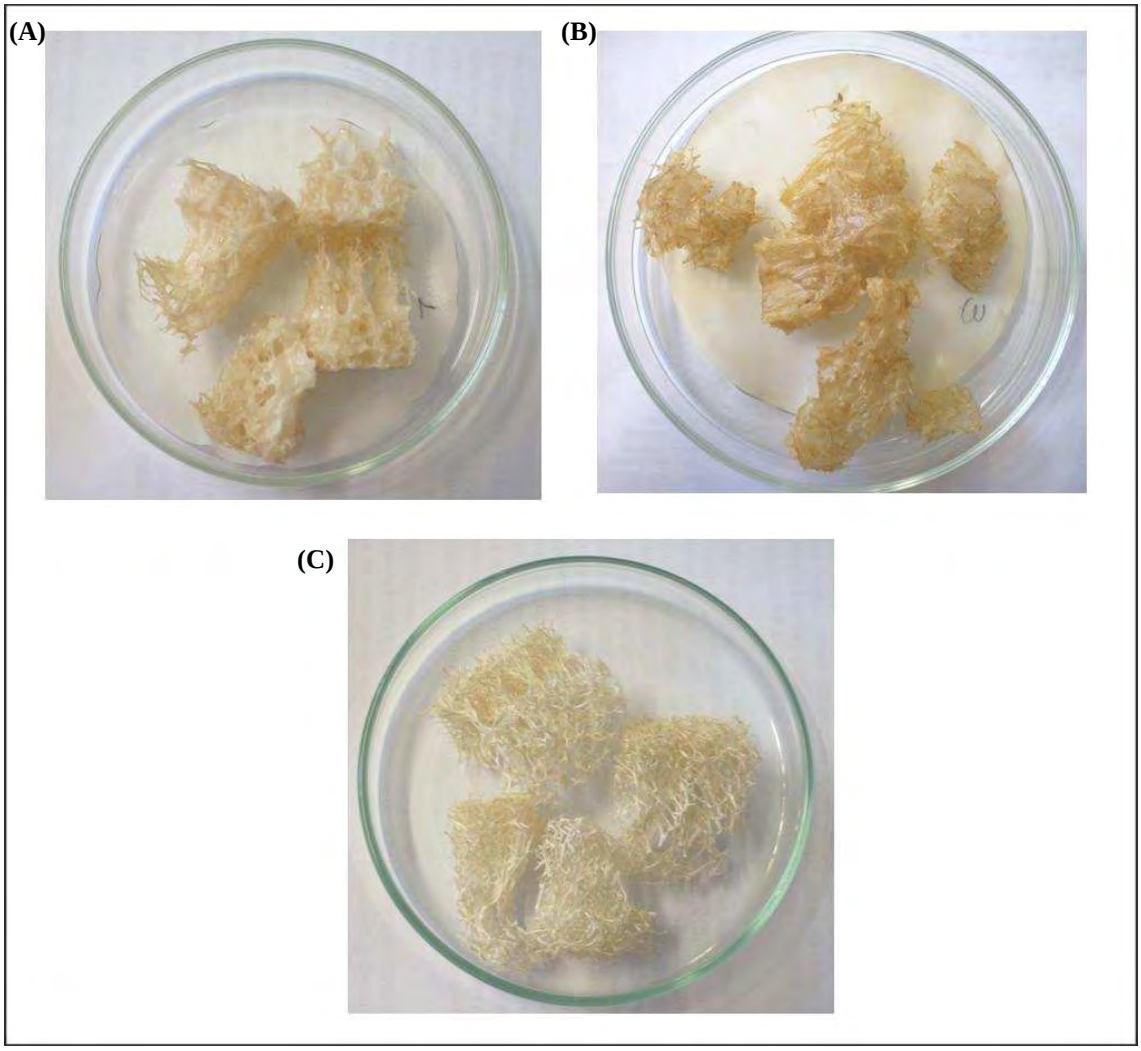


Figura 3. (A) Bucha vegetal com as hifas fúngicas úmidas imobilizadas; **(B)** Bucha vegetal com as hifas fúngicas secas imobilizadas; **(C)** Bucha vegetal antes da imobilização.

A figura 4 mostra a curva de fermentação utilizando o fungo *Myceliophthora* sp F2.1.1 imobilizado assim como a atividade de lipase presente no meio de cultura. Observa-se o pico de atividade de lipase, determinada com hifa imobilizada, ocorrendo em 48 h com 119 U/g de biomassa seca. O pico de crescimento fúngico acompanhou a curva de atividade, com 1,33 g de biomassa seca/g de suporte. Não foi detectada atividade de lipase no extrato líquido. Em 72h de cultivo, houve pouca variação da atividade de lipase. Entretanto, após esse período iniciou-se uma intensa decomposição da bucha vegetal, possivelmente devido a produção de enzimas hemi-celulolíticas, visto que linhagens do gênero *Myceliphthora* foram considerados bom produtores dessas enzimas (MORETTI, 2010) (figura 5).

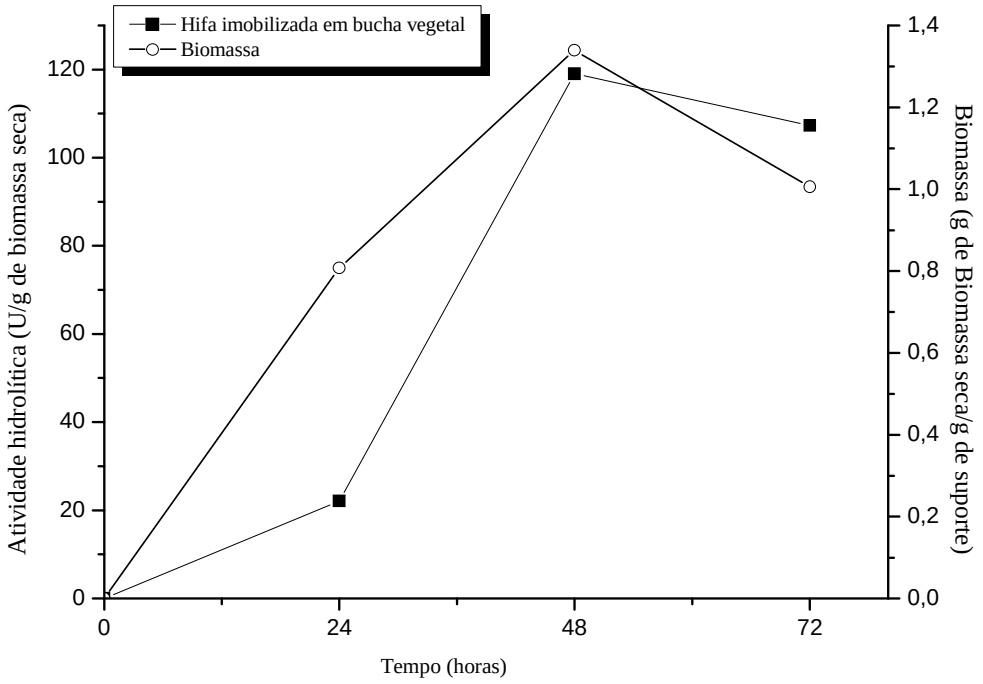


Figura 4. Atividade de lipase e crescimento da hifa imobilizada de *Myceliophthora* sp F2.1.1 em bucha vegetal. Quantificação por titulometria descrito em 3.4.

Figura 5. *Myceliophthora* sp M7.7 imobilizado em bucha vegetal após 72 horas de fermentação, mostrando a degradação da bucha.

Foi também estudada a linhagem *Myceliophthora* sp F2.1.3, cujo o pico de atividade de lipase, usando a hifa imobilizada, também foi observado em 48h com 168 U/g de biomassa seca de atividade (figura 6). A maior produção de biomassa foi obtida em 24h, com 1,25 g de biomassa seca/g de suporte. Em 72h foi observado 1,66 U/mL de atividade de lipase no meio

de cultura.

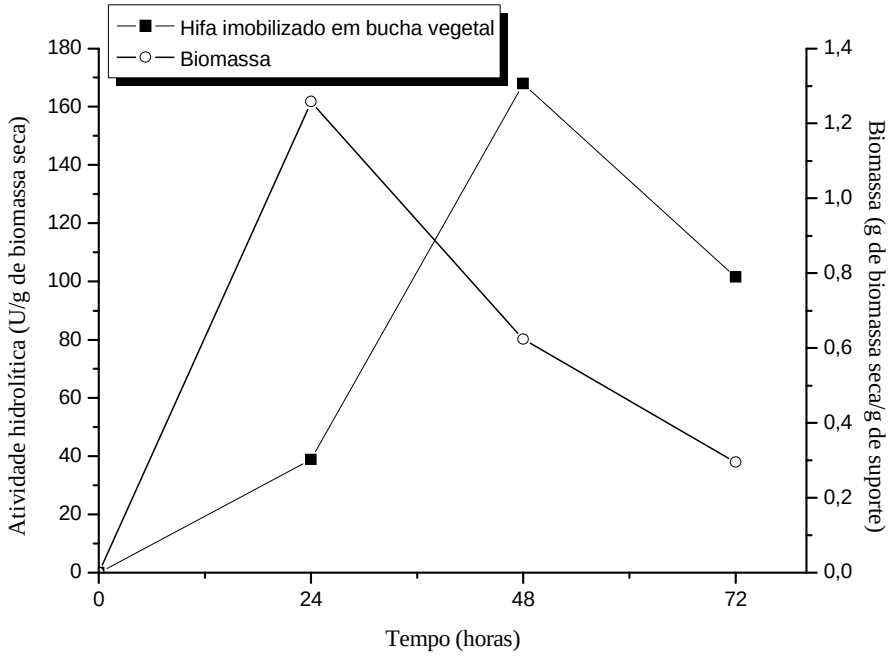


Figura 6. Atividade de lipase e crescimento da hifa imobilizada de *Myceliophthora* sp F2.1.3 em bucha vegetal. Quantificação por titulometria descrito em 3.4.

Outra linhagem testada, *Myceliophthora* sp M7.7 mostrou perfis de produção de enzima e biomassa bastante diferentes dos observados para as outras linhagens. A maior atividade de lipase foi detectada após 24 h de cultivo (303 U/g de biomassa seca) (figura 7) sendo consideravelmente maior que as determinadas para outras linhagens. Observou-se a atividade de lipase no meio de cultura em 120h, 3,44 U/mL. Entretanto, o pico de produção de biomassa ocorreu no mesmo período de fermentação (48 h). Destaque-se que, para as 3 linhagens de *Myceliophthora* sp, houve uma redução da biomassa imobilizada sugerindo ruptura das hifas, sem, no entanto, ter sido detectada atividade de lipase no meio de cultura de todas as espécies testadas. Desse modo, não tem como se inferir que a enzima possa estar associada à parece celular.

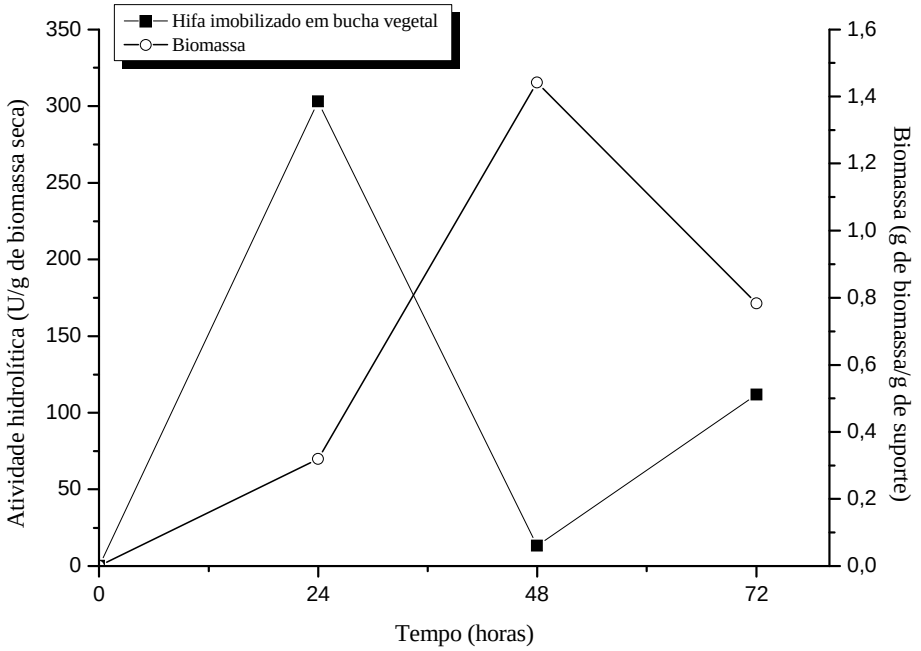


Figura 7. Atividade de lipase e crescimento da hifa imobilizada de *Myceliophthora* sp M7.7 em bucha vegetal. Quantificação por titulometria descrito em 3.4.

Outra espécie estudada, *Rhizomucor pusillus*, não apresentou a degradação do suporte vegetal, podendo seu crescimento e atividade de lipase ser acompanhados até 120h. Conforme dados da Figura 8, esse fungo foi o maior produtor de lipase entre as cepas estudadas, 365 U/g de biomassa seca em 48h. Note-se que diferente de outros espécimes, foi detectado atividade de lipase em meio liquido (3 U/mL) em 96h (figura 9).

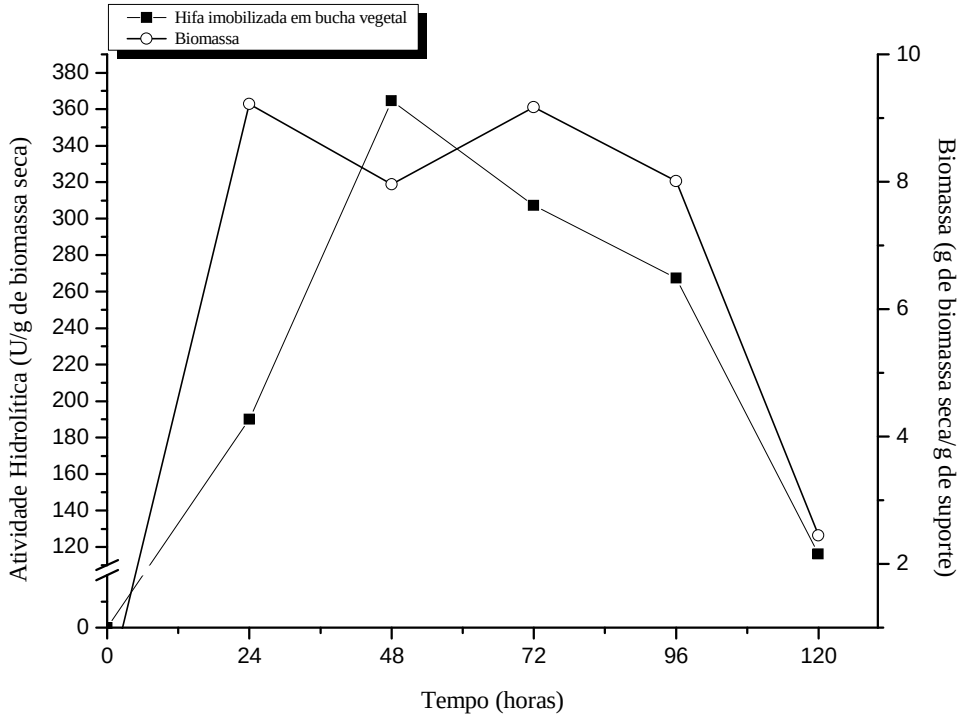


Figura 8. Atividade de lipase e crescimento da hifa imobilizada de *Rhizomucor pusillus* em bucha vegetal. Quantificação por titulometria descrito em 3.4.

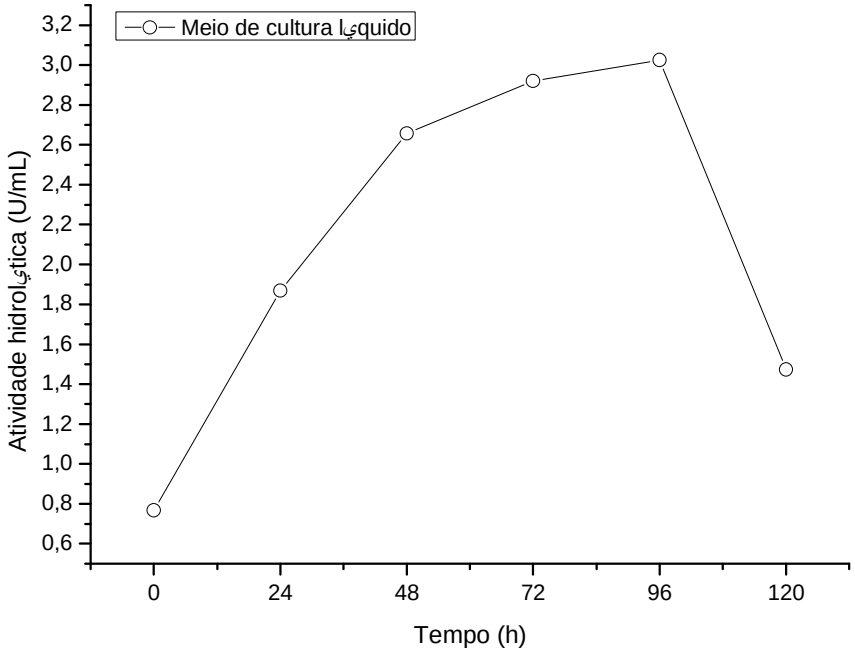


Figura 9. Atividade de lipase do meio de cultura líquida da FSm de *Rhizomucor pusillus*. Quantificação por titulometria descrito em 3.4.

O imobilizado de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (figura 10), apresentou pico de atividade em 48h com 108 U/g de biomassa seca, e dois picos de crescimento, um 48 e outro em 96 h com 1,32 e 1,38 g de biomassa seca/g de suporte, respectivamente.

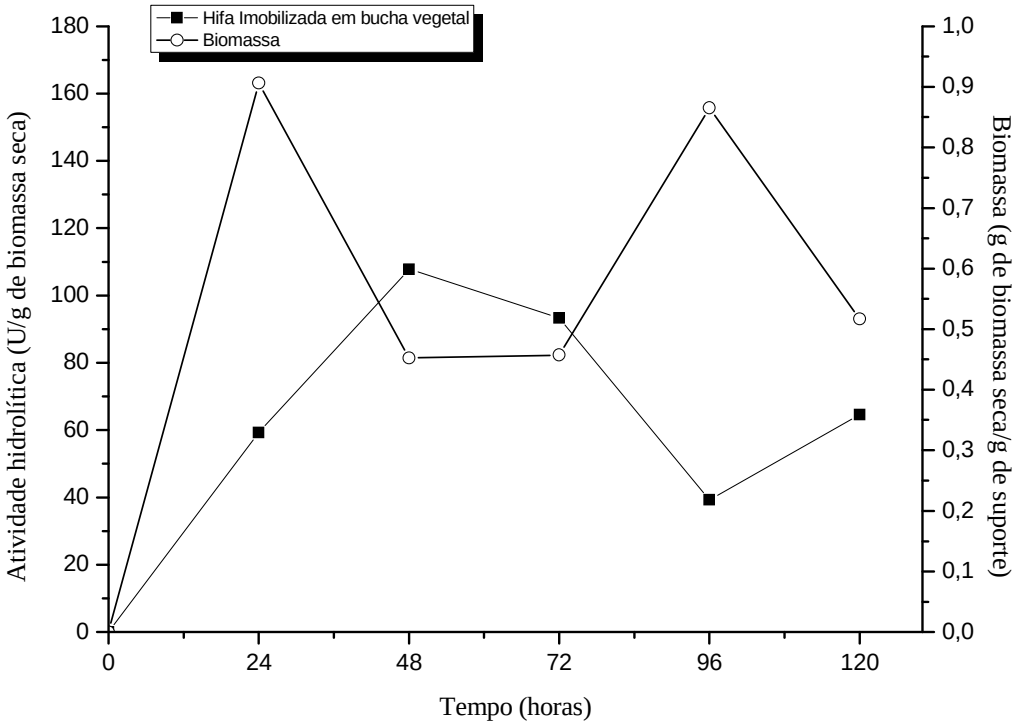


Figura 10. Atividade de lipase e crescimento da hifa imobilizada de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em bucha vegetal. Quantificação por titulometria descrito em 3.4.

Para *Thermomyces lanuginosus* TO-05 houve a produção de 128 U/g de biomassa seca em 72 h (figura 11), porém o pico de crescimento ocorreu apenas em 120h com 1,14 g de biomassa seca/g de suporte. A partir de 72 h o crescimento fúngico começa a aumentar, provavelmente por que a enzima produzida começa a hidrolisar o óleo presente no meio, utilizado como fonte de carbono. A partir desse período com o carbono presente no meio, o fungo aumenta o seu crescimento e a quantidade de enzima produzida começa a diminuir.

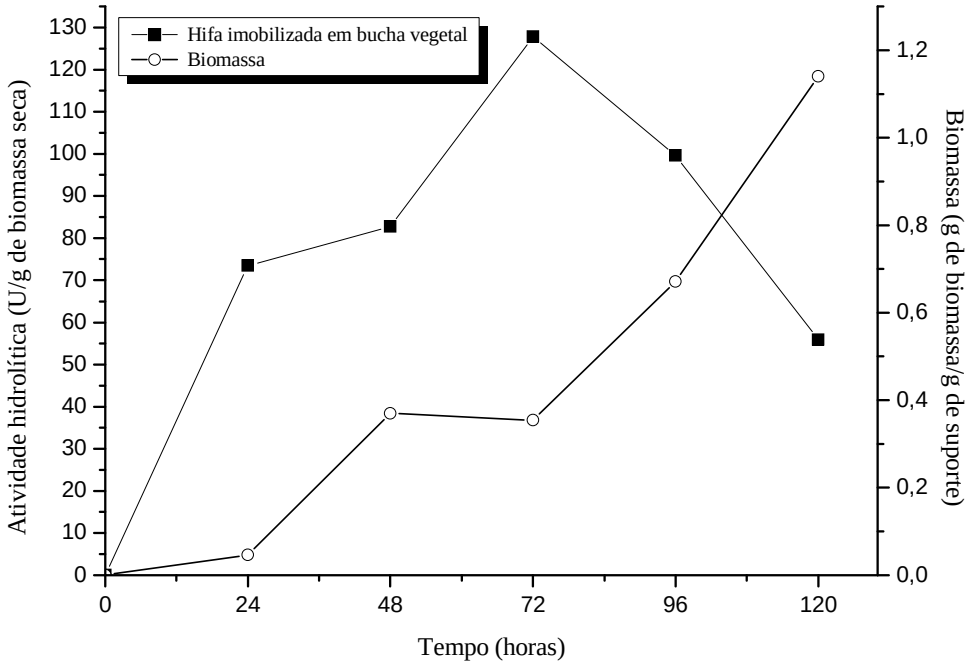


Figura 11. Produção de lipase e crescimento da hifa imobilizada de *Thermomyces lanuginosus* TO-05 em bucha vegetal. Quantificação por titulometria descrito em 3.4.

Adamczak et al. (2004) também encontraram alta produção de lipase para *Rhizomucor miehei* e *Yarroia lipolitica* imobilizados em esponja de poliuretano, 130,5 e 90,3 U/g, respectivamente, sendo esses valores 2,1 a 4,3 vezes maiores do que o observado para fermentações com a biomassa livre (30,2 e 27,8 U/g respectivamente). Esses autores observaram também que as hifas imobilizadas foram mais termoestáveis e apresentaram maior estabilidade me relação ao pH do que as lipases livres obtidas dos mesmos fungos.

Ban e colaboradores (2001) avaliaram variações no meio de cultivo para produção de lipase e as condições da metanólise utilizando biomassa de *R. oryzae* imobilizada em esponja de polipropileno, e observaram um rendimento de 90% na conversão de óleo de oliva ou ácido oléico em ésteres.

A tabela 2 resume dados obtidos em experimentos usando diferentes métodos de fermentação. A comparação entre as atividades obtidas desses experimentos mostra que os maiores valores de produção de lipase foram observados quando as hifas foram imobilizadas.

Tabela 2. Comparação entre os diferentes processos de fermentação utilizados para a produção de lipase e a imobilização das hifas em bucha vegetal. [1]Método fotométrico de quantificação de atividade; [2] Método titulométrico.

Fungos	***FSm (U/mL)***	***FES (U/g)*[2]**	**Imobilização em bucha (U/g)[2]**
Myceliophotora sp F2.1.1	Não testado	31,50	119,00
Myceliophotora sp F2.1.3	Não testado	7,50	168,00
Myceliophotora sp M7.7	Não testado	27,00	303,00
Rhizomucor pusillus	1,20[1]	Não testado	365,00
Thermomucor indicae-seudaticae N31	5,50[2]	21,00	108,00
Thermomyces lanuginosus TO-05	Não testado	1,60	155,00

Esses dados são importantes, pois mostram a viabilidade da imobilização e de uma possível aplicação, podendo ser considerada uma técnica inovadora já que poucos relatos foram encontrados na literatura. Tem-se observado a utilização direta das células fúngicas liofilizadas nas reações, e em menor proporção células imobilizadas. Esse procedimento é fácil e barato, e pode acarretar em maior estabilidade da enzima. Esses fatores são relavantes, pois barateiam o custo da produção de enzimas para a utilização como biocatalisadores.

4.2 Seleção das hifas imobilizadas pela esterificação

As buchas com as hifas imobilizadas foram liofilizadas para garantirmos o mínimo de presença de água no meio da reação. A reação de esterificação ocorreu com mistura de ácido oléico e etanol, e por ácido butírico e n-butanol a 45º C e 150 rpm por 40 min (figura 12). Após esse período, as amostras foram tituladas com KOH e depois analisadas em cromatógrafo gasoso. *Myceliophthora* sp M7.7 apresentou atividade esterificante na presença dos dois ácidos graxos utilizados e foi um dos fungos que apresentou maiores valores de atividade esterificante (29 U/g para ácido oléico e 23 U/g para o ácido butírico). *T. indicae-seudaticae* N31, apresentou atividade de esterificação na presença de ácido oléico (14U/g) e butírico (10 U/g), mas apresentou atividades intermediárias se comparado à linhagem anterior. *T. lanuginosus* TO-05 e *Myceliophthora* sp F2.1.3, apresentaram atividade somente na presença de ácido oléico, sendo as atividade 16 e 29U/g, respectivamente. O fungo *Myceliophthora* sp F2.1.1 mostrou atividade somente na presença de ácido butírico (19,8 U/g). e *R. pusillus,* na presença de ácido oléico e ácido butírico, 26 U/g e 7 U/g respectivamente. A maioria dos imobilizados apresentou maior atividade na presença de ácido oléico, provavelmente o ácido butírico pode causar algum tipo de inibição na lipase por ser um ácido graxo de cadeia curta (OLIVEIRA et al., 2000).

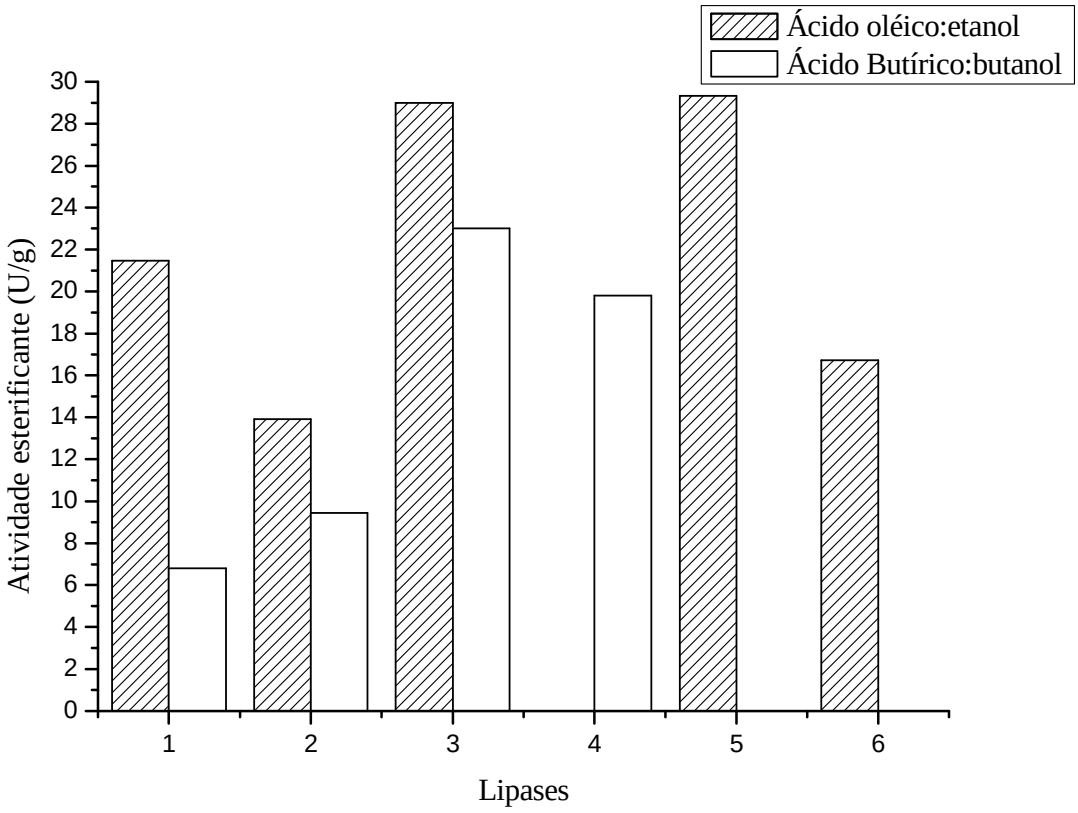


Figura 12. Atividade de esterificação das lipases presentes nas hifas imobilizadas de fungos termofílicos em duas situações reacionais: (1) *R. pusillus*; (2) *T. indicae-seudaticae* N31; (3) *Myceliphtora* sp M7.7; (4) F2.1.1; (5) F2.1.3; (6) *T. lanuginosus* TO-05.

Analisando-se o gráfico (figura 13), observa-se que os maiores rendimentos, obtidos na reação de esterificação na presença de ácido oléico, foram de 80 e 70% para *R. pusillus* e *Myceliophthora* sp M7.7, respectivamente em 40 minutos de reação. Seguidos por *T. inidicae-seudaticae* N31 (17%), *T. lanuginosus* TO-05 (18%), *Myceliophthora* sp F2.1.1 e *Myceliophthora* sp F2.1.3 (10%). A lipase livre de *Candida antarctica* B apresentou um rendimento de 70-80% na conversão de ácido oléico após sete horas de reação (FORESTI et al., 2007). Bancerz e Ginalska (2007) conseguiram a maior taxa de conversão depois de 72h na síntese de butil caprilato tanto para a enzima livre quanto para a imobilizada (93 e 97%).

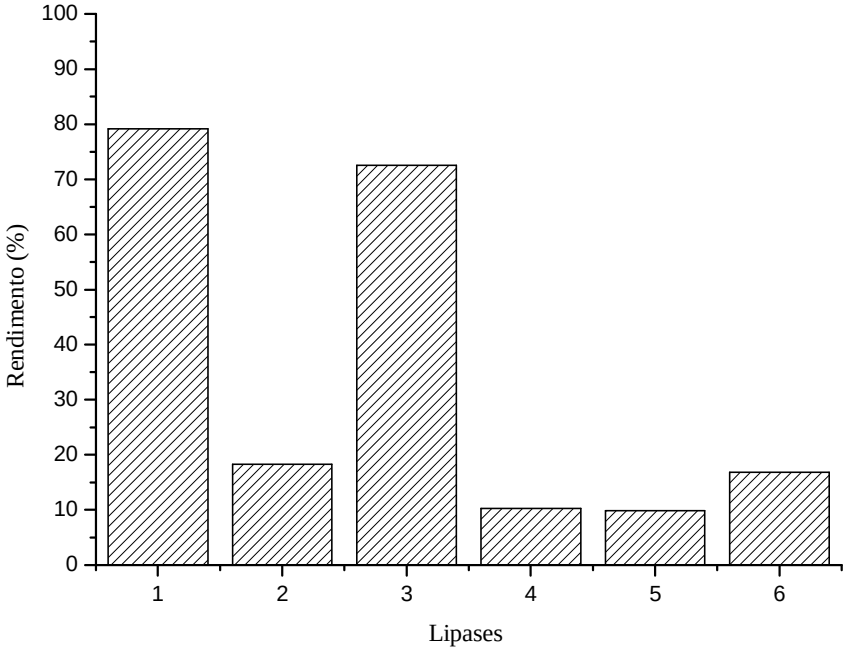


Figura 13. Rendimento das reações de esterificação catalisadas por lípases presentes nas hifas imobilizadas de fungos termofílico: (1) *R. pusillus*; (2) *T. indicae-seudaticae* N31; (3) *Myceliphtora* sp M7.7; (4) F2.1.1; (5) F2.1.3; (6) *T. lanuginosus* TO-05.

Devido ao alto rendimento da reação de esterificação catalisada por *R. pusillus* e *Myceliophthora* sp M7.7, os mesmos foram submetidos a uma análise de caracterização hidrolítica visando maior conhecimento da enzima para a aplicação na reação de transesterificação. Foi testada a hidrólise dos seguintes óleos: soja (C18:2), canola (C18:1), oliva (C18:1), algodão (C18:2), girassol (C18:2) e palma (C18:1) (figura 14).

R. pusillus apresentou maior atividade na presença de óleo de soja e de canola, ambos com maiores concentrações de ácidos graxos C18:1 e C18:2. *Myceliophotora* sp M7.7, a maior atividade foi em óleo de girassol, com maior concentração de ácidos graxos C18:2 (figura 14). Desse modo, as hifas imobilizadas dos dois fungos foram submetidas a transesterificação na presença desses óleos.

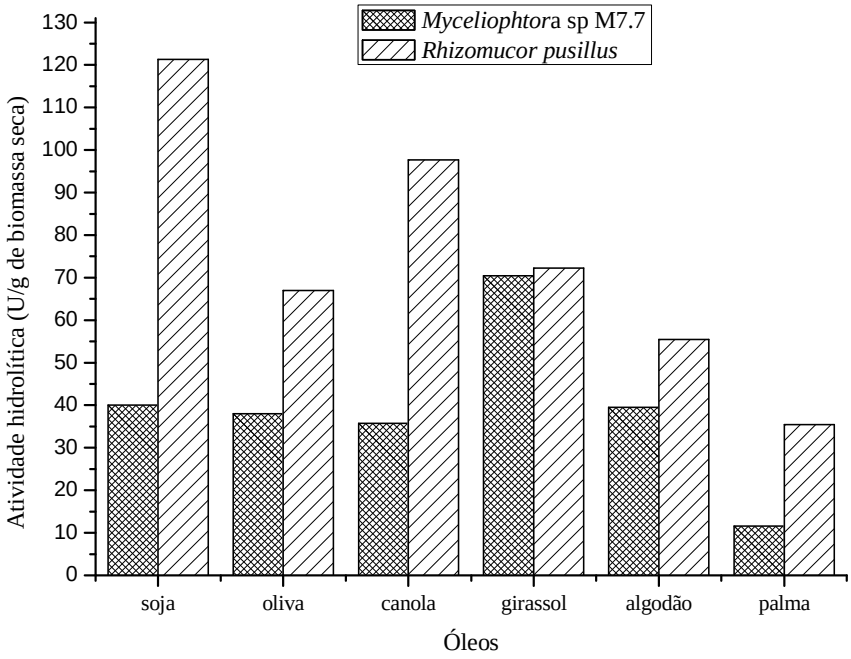


Figura 14. Hidrólise na presença de vários óleos, a análise foi realizada por titulometria.

4.3 Transesterificação

Myceliophotora sp M7.7 foi submetido à transesterificação do óleo de girassol com etanol, a uma razão molar 1:6 (óleo:álcool), na presença de hexano como solvente, a 45ºC a 150 rpm por 111h, mas apresentou apenas traços de ésteres quando analisados por cromatografia. Provamos, no entanto, que a lipase desse fungo apresenta uma atividade esterificante. Novas análises devem ser realizadas para conhecimento da enzima, como temperatura ótima e estabilidade em solventes orgânicos, e um estudo das condições da transesterificação, pois vários fatores podem ter influenciado no insucesso da reação, como inibição por excesso de álcool ou hexano, temperatura imprópria, entre outros.

O gráfico 15 mostra a produção dos ésteres por *R. pusillus* tanto na presença de óleo de canola como na presença de óleo de soja. Comparando os cromatogramas das amostras com o cromatograma dos padrões observamos que ocorreu a formação dos quatro principais ésteres presentes nestes óleos.

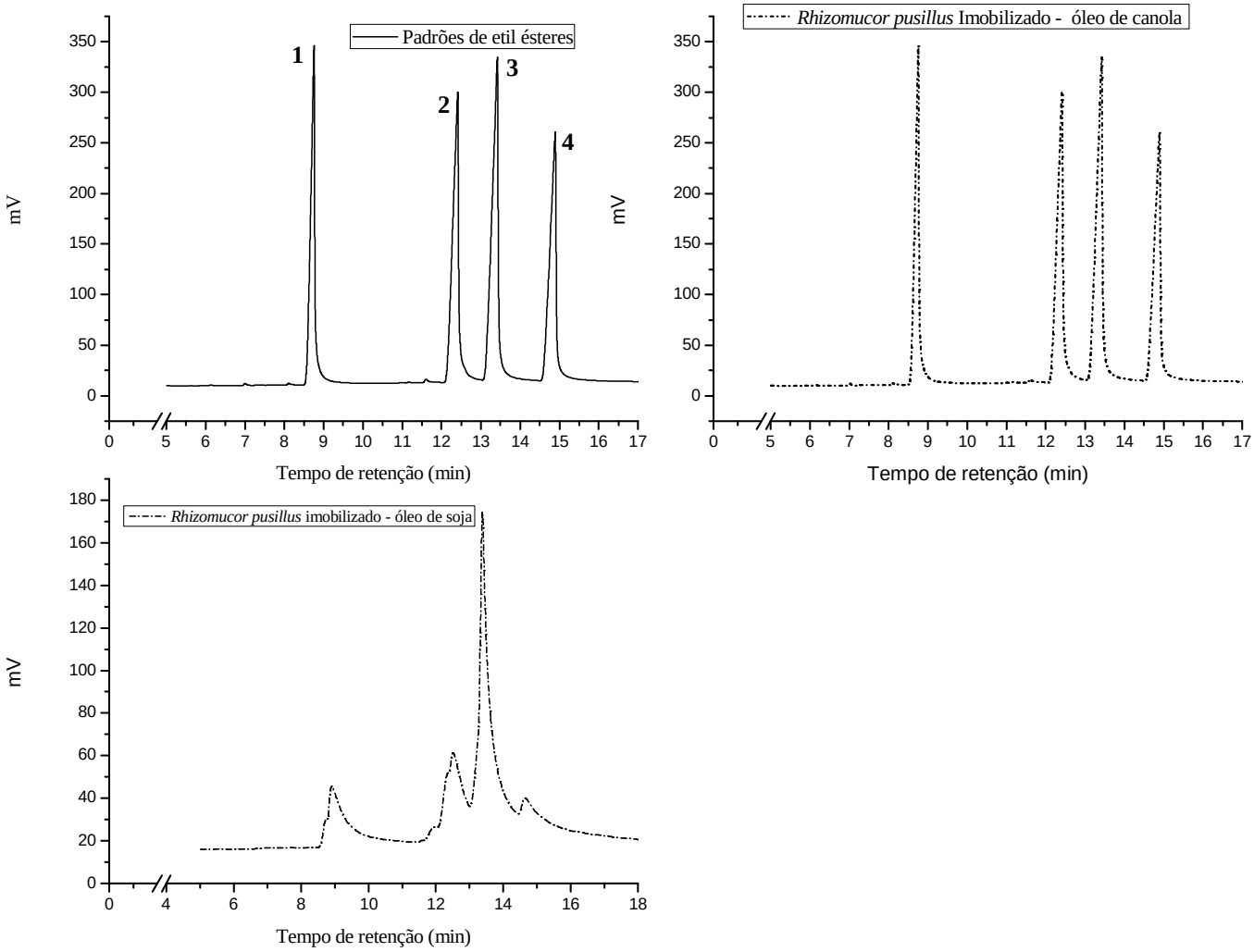


Figura 15. Cromatograma da análise da transesterificação catalisada pela hifa de *R. pusillus* imobilizada em bucha. **(A)** Padrão de etil ésteres: 1. etil palmitato, 2. etil oleato, 3. etil linoleato, 4. etil linolenato; **(B)** Transesterificação com óleo de canola; **(C)** Transesterificação com óleo de soja.

O rendimento da reação no qual foi usado o óleo de canola foi de 11,82% e de 12,45% para o óleo de soja (tabela 3). Dizge e Keskinler (2008) imobilizaram a lipase de *T. lanuginosus* em cubos de poliuretano, e obtiveram 90% de conversão de ésteres adicionando metanol à reação em três passos, também utilizaram a razão molar 1:6 e 40ºC por 24h, obtendo 10 reutilizações sem perder o rendimento.

Pires-Cabral e colaboradores (2010) também encontraram um baixo rendimento na presença da lipase de *Candida rugosa* (AY 30) imobilizada em esponjas de poliuretano como catalizador, utilizando ácido butírico e etanol como substrato. O baixo rendimento do biocatalisador pode depender de vários fatores, como o efeito da água na reação, composição

do meio, condições de operação, entre outros. Esses fatores levaram os autores a testarem as condições da reação, e depois de adequarem a concentração do álcool conseguiram obter um rendimento por volta de 80%.

Tabela 3. Conversão de ésteres obtidos após a reação de transesterificação mostrada no cromatograma da figura 14.

Amostra	Conversão (%)
Rhizomucor pusillus – óleo de canola	11,82
Rhizomucor pusillus – óleo de soja	12,45

Salis e colaboradores (2008) realizaram uma seleção de oito enzimas comerciais (*Mucor javanicus*, *Penicillium camembertii*, *Rhizopus oryzae*, *Candida rugosa*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas cepacia* e *Pseudomanas fluorescens*) imobilizadas em polímeros de polipropileno em reação de transesterificação utilizando óleo de soja e metanol em uma razão molar de 1:8 a 40ºC. Apenas *P. fluorescens* e *P. cepacia* apresentaram atividade transesterificante com rendimento de 59% (depois de 22h) e 37% (depois de 51,7h), respectivamente. A primeira foi escolhida para se estudar as condições experimentais da reação, alcançando um rendimento 96% (depois de 49h) após o estudo. Da diferença de poder catalítico entre as duas espécies surgiu a hipótese de que o polímero protege mais a *P. cepacia* do efeito inibitório causado pelo metanol, sendo essa hipótese levantada também por outros autores em relação a outros suportes, Nouredini et al. (2005) e Shah et al. (2007).

O micélio liofilizado de *Rhizopus chinensis* foi utilizado em estudo de otimização da transesterificação, e foi obtido um rendimento 93% da conversão em éster avaliando as seguintes condições: razão molar (óleo:álcool), efeito do conteúdo de água, efeito de solventes orgânicos e temperatura (QIN et al.,2008).

Vários fatores podem interferir na transesterificação, alguns podem causar um efeito inibitório na atividade enzimática, por isso a importância de se estudar as condições ótimas da reação. Vários autores (DIZGE, KESKINLER, 2008; NOUREDINI et al., 2005; PIRES-CABRAL et al., 2005; SALIS et al., 2008) analisaram vários fatores como: temperatura, quantidade de enzima, concentração de álcool, quantidade de água e reutilização dos imobilizados. Provando a necessidade de se estudar os fatores da reação de transesterificação para se obter sucesso na produção do biodiesel.

V.5 CONCLUSÃO

Todos os fungos foram imobilizados com sucesso, a atividade de lipase pelas hifas imobilizadas foi a maior em relação aos outros métodos de fermentações empregadas neste trabalho. Na seleção das hifas imobilizadas dois fungos (*Rhizomucor pusillus* e *Myceliophthora* sp M7.7) apresentaram alta atividade esterificante provadas pelos altos rendimento obtidos (70-80%) em apenas 40 minutos de reação.

Esses fungos foram então submetidos à transesterificação a uma razão molar 1:6 e presença de hexano 1:1,5 em relação ao óleo. A conversão dos óleos testados foram de apenas 12% para o *R. pusillus* e apenas traços para *Myceliophthora* sp M7.7. Nenhum estudo foi feito em relação as condições da reação. Como foi sugerido por vários autores, existe a necessidade de se melhorar as condições da reação na tentativa de encontrar os fatores que aperfeiçoem a conversão do óleo em ésteres. Devido a isso não podemos concluir que a lipase *R. pusillus* não seja uma enzima com potencial de atuação na produção do biodiesel.

V.6 REFERÊNCIAS

ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Enhanced activity of intracellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles, **Process Biochemistry**, v. 39, p.1347-1361, 2004.

BAN, K. et al. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing Rhizopus oryzae cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 39-43, 2001.

BANCERZ, R.; GINALSKA, G., A novel thermostable lipase from Basidiomycete *Bjerkandera adusta* R59: characterisation and esterification studies. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,** v. 34, p. 553-560, 2007.

BERNARDES, O.L. et al. Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized Lipase**. Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, p. 105-114, 2007.

CASTRO-OCHOA, L .D. et al. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR 11. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 648-654, 2005.

DIZGE, N., KESKINLER, B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 1274-1278, 2008.

FORESTI, M.L. et al. Multiple effects of water on solvent-free enzymatic esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 62-70, 2007.

ISO M. et al. Production of biodiesel fuel fromtriglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal Molecular of Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, p. 53–58, 2001.

LANGONE, M.A.P.; SAN'ANNA JR, G.L. Enzymatic syntesis of medium-chain tryglicerides in a solvent-free system. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 77-79, p. 759-770, 1999.

SOARES, C. M. F. et al. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore sílica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, n. 2, p. 745-757, 1999.

MORETTI, M. M. S. **Isolamento de fungos termofílicos produtores de celulases, xilanases e ferruloil esterase para bioconversão de bagaço de cana de açúcar em açúcares fermentescíveis.** Rio Claro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista.

NOUREDDINI, H. et al. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 769-777, 2005.

OLIVEIRA, P.C. et al. Síntese de butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 632-636, 2000.

PIRES-CABRAL, P. et al. Partitioning of water in organic systems with lipase immobilized in polyurethane foams. **Biochemical and Bioengineering Journal**, v. 26, p. 29-37, 2005.

PIRES-CABRAL, P. et al. Esterification activity and operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams in the production ethyl butyrate. Y **Biochemical and Bioengineering Journal**, v. 48, p. 246-252, 2010.

QIN, H. et al. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 29, n. 1, p. 41-46, 2008.

SALIS, A. et al. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 291–299, 2005.

SALIS, A. et al. Comparison among immobilized lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, p. 19-26, 2008.

SHAH, S. et al. Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of jatropha oil. **Energy and Fuels**, v. 18, p. 154–159, 2004.

SHAH, S., GUPTA, M. N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. **Process Biochemistry**, 2006.

SHAH, S., GUPTA, M.N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 409–414, 2007.

SHIEH, C.J. et al. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 103–106, 2003.

SOARES, C. M. F. et al. Characterization and utilization of Candida rugosa lipase immobilized on controlled pore sílica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, n. 2, p. 745-757, 1999.

TAN, T. et al. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. Biotechnology Advances, (doi:10.1016/j.biotechadv.2010.05.012) in press 2010.

TORRES, C. F. et al. Ethanolysis of a waste material from olive oil distilation catalyzed by three different commercial lipases: A kinetic study. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 165-171, 2007.

URIOSTE, D. et al. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 407-412, 2008.

VILLENEUVE P et al. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal Molecular of Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113–148, 2000.

WANG J-X. Lipase-catalyzed production of biodiesel from high acid value waste oil using ultrasonic assistant. **Chinese Journal of Biotechnology**, v.23, p. 1121–1128, 2007.

WATANABE Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 77, p. 355–360, 2000.

CONCLUSÃO GERAL

O tema do presente trabalho é pioneiro no nosso grupo de pesquisa, desse modo, foi muito representativo, pois acarretou na padronização de várias metodologias. Possibilitando também a seleção de várias cepas termofílicas que apresentaram potencial de produção de lipase, e apesar de algumas linhagens não apresentarem atividade transesterificante podem ser utilizadas de outros trabalhos dentro do nosso grupo de pesquisa.

Pode-se concluir que a fermentação em estado sólido levou a seleção de um maior número de linhagens produtores da enzima, no entanto, a imobilização das hifas foi fundamental para o aumento na produção de lipase e para aplicação da enzima.

Os estudos das condições das fermentações se mostraram necessários, já que todos acarretaram num aumento do rendimento de lipase pelos fungos avaliados. Conseguimos selecionar pelo menos uma linhagem termofílica ao qual apresentou lipases com capacidade de síntese. No entanto, verificou-se a necessidade de um estudo das condições das reações de transesterificação para a produção do biodiesel, visto que, a conversão encontrada foi baixa. Conforme observado na literatura, vários fatores podem influenciar no rendimento desse tipo de reação (temperatura, quantidade água, razão molar de óleo e álcool, presença de solventes e agitação), justificando a importancias desses estudos que serão realizados em trabalhos futuros pelo nosso grupo de pesquisa.

APÊNDICE A:
Figuras e Tabelas

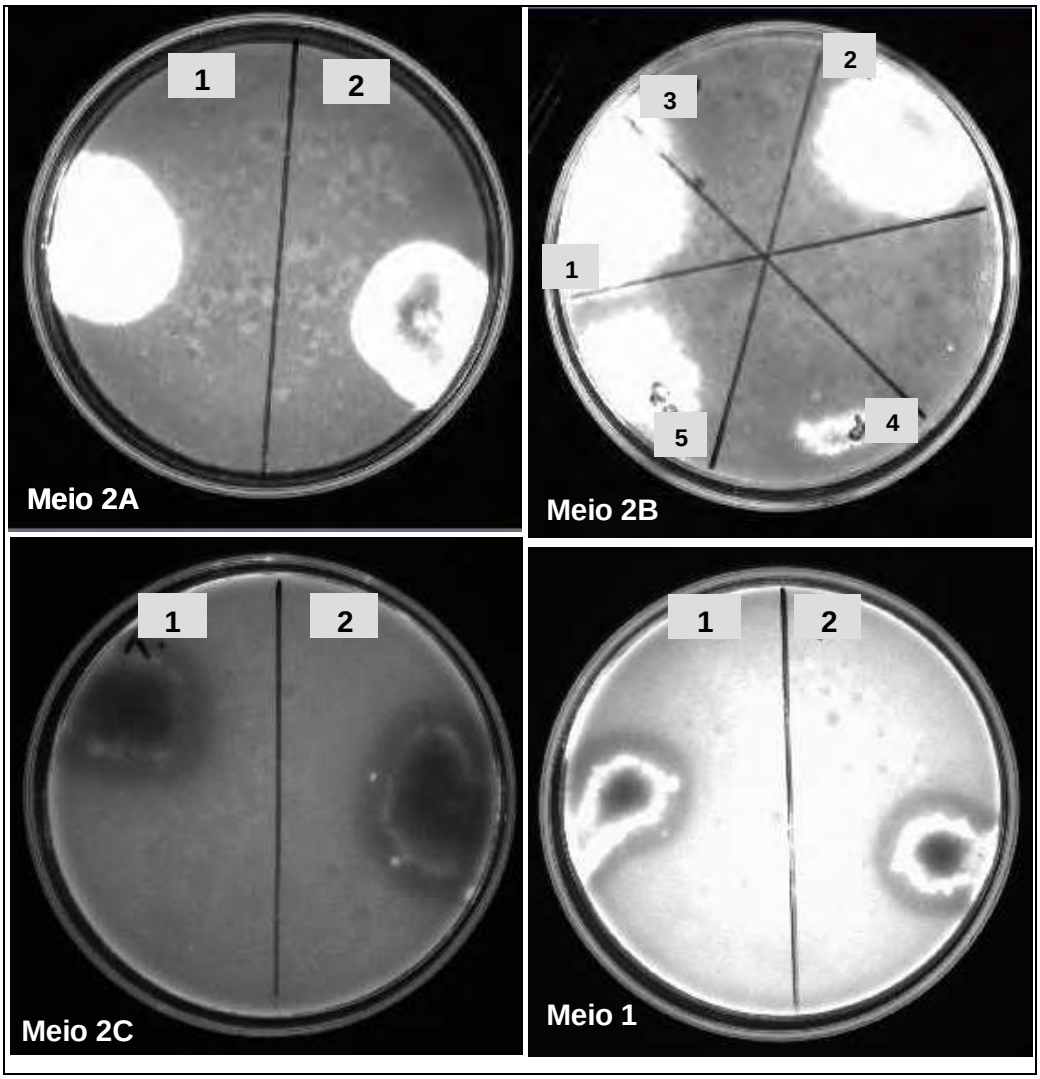


Figura 1A. Detecção da atividade lipolítica em placa em diferentes meios. **Meio 1**: Meio nutriente modificado de Castro-Ochoa et al. (2005) descrito em 3.3. **Meio 2 - A, B e C**: Meio nutriente descrito em 3.3; Linhagens testadas: **1.** *Thermomucor indicae-seudaticae* N31; **2.** *Rhizomucor pusillus;* **3.** *Thermoascus aurantiacus*; **4.** *Aspergillus fumigatus* N12; **5.** *Thermomyces lanuginosus* Rob.

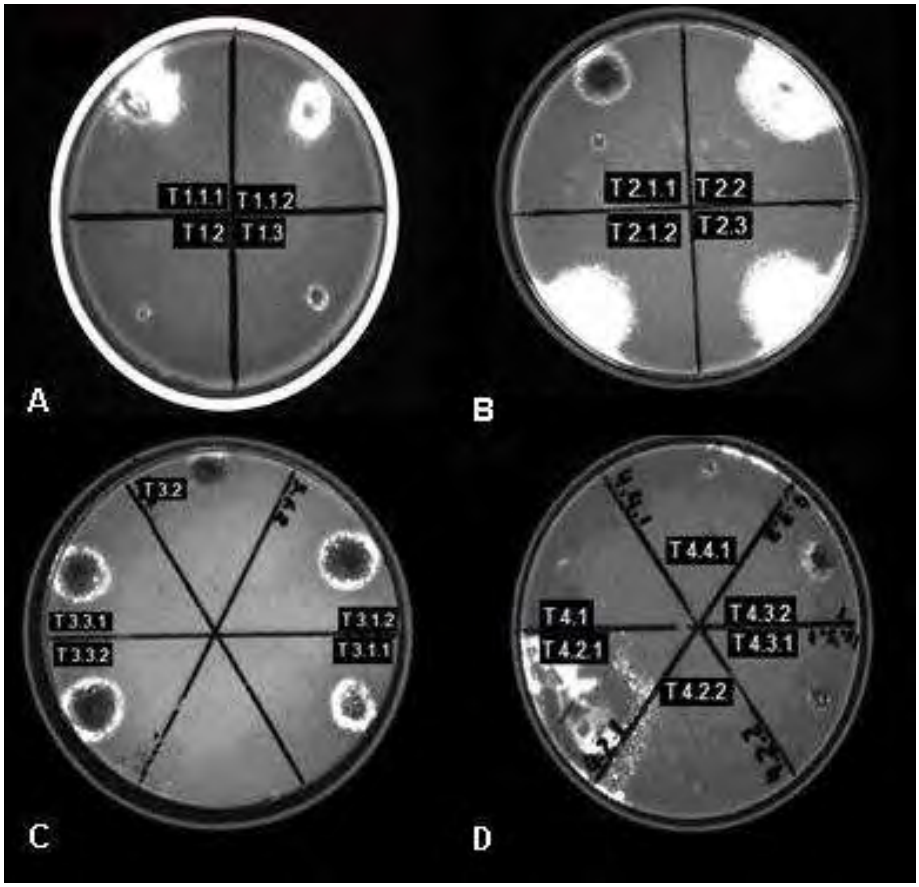


Figura 2A. Detecção da atividade de lipase em placa pelos fungos isolados do ambiente em Meio nutriente 3 descrito em 3.3 na presença de Rhodamina B: **A:** *Thermomyces* sp T1.1.1, *Aspergillus* sp T1.1.2, T1.2, T1.3; **B:** T2.1.1, T2.2, T2.1.2, *Humicola* sp T2.3; **C:** T3.2, *Aspergillus* sp T3.3.1, T3.3.2, T3.1.2, T3.1.1; **D:** T4.1, T4.2.1, T4.2.2, T.4.3.1, T4.3.2, T4.4.1.

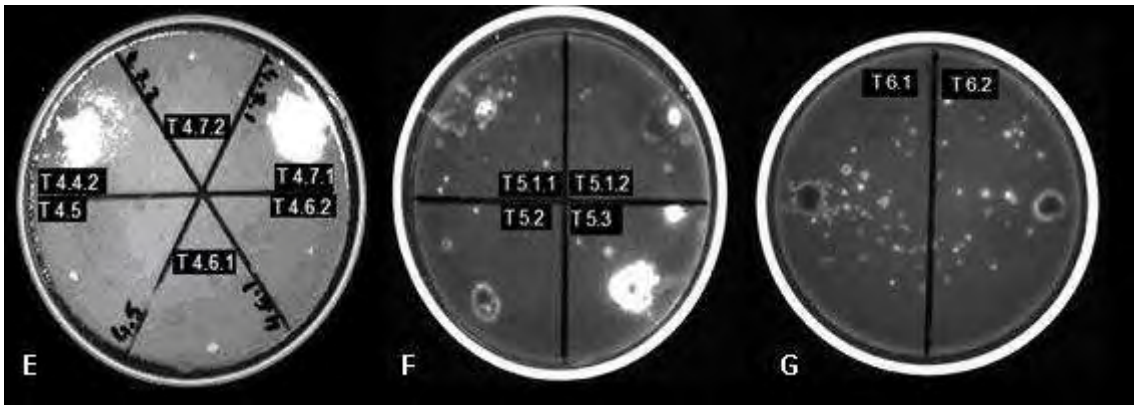


Figura 3A. Detecção da atividade de lipase em placa de fungos coletados e isolados do ambiente em Meio nutriente 3 descrito em 3.3 na presença de Rhodamina B: **E:** *Thermomyces* sp T4.4.2, T4.5, T4.6.1, T4..6.2, *Thermomyces* sp T4.7.1, T4.7.2; **F:** T5.1.1, T5.1.2, T5.2, *Aspergillus* sp T5.3; **G:** T6.1, T6.2.

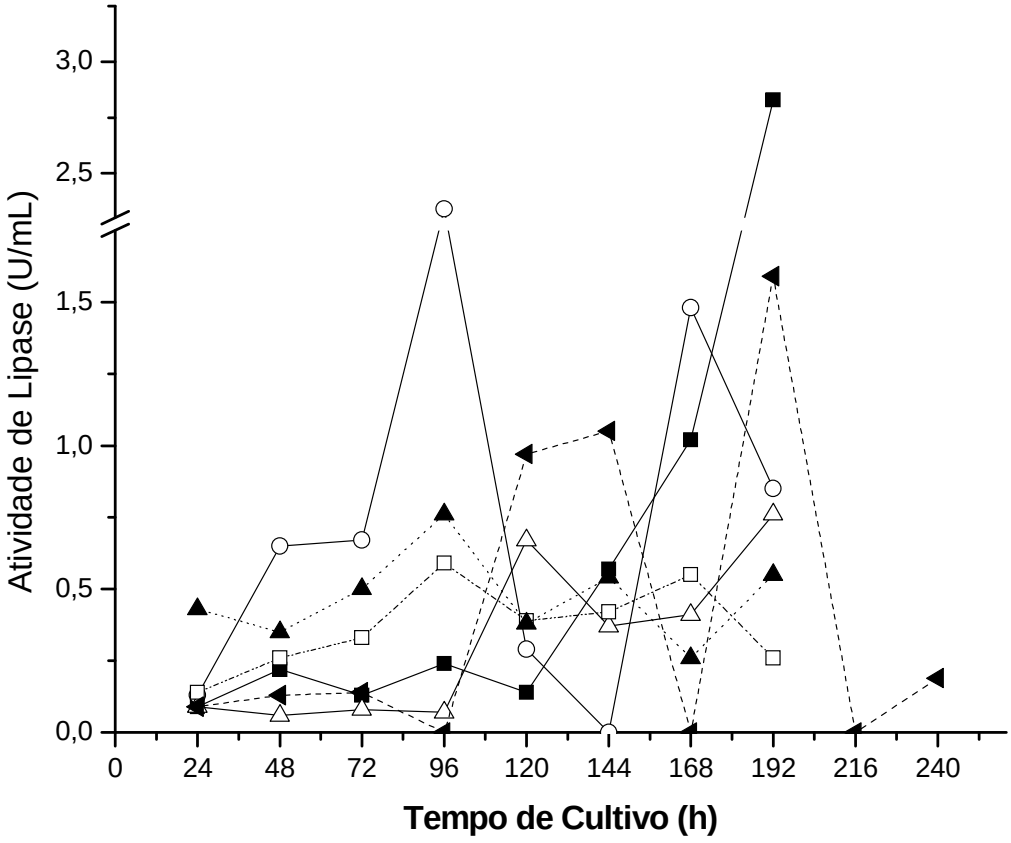


Figura 4A. Efeito de variáveis no meio nutriente descrito no item 3.4, usado durante o processo de fermentação submersa pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. (○) 1,0 g.L^{-1} glicose, 20,0 g.L^{-1} Tween 80 e óleo de soja; (Δ) 1,0 g.L^{-1} glicose, 8,0 g.L^{-1} Tween 80 e óleo de fritura; (◄) Ausência de glicose, 8,0 g.L^{-1} Tween 80 e óleo de soja; (▲)Ausência de glicose, 20,0 g.L^{-1} Tween 80 e óleo de soja; (□) 1,0 g.L^{-1} glicose, 20,0 g.L^{-1} Tween 80 e óleo de fritura; (■) 1,0 g.L^{-1} glicose, 8,0 g.L^{-1} Tween 80 e óleo de soja;

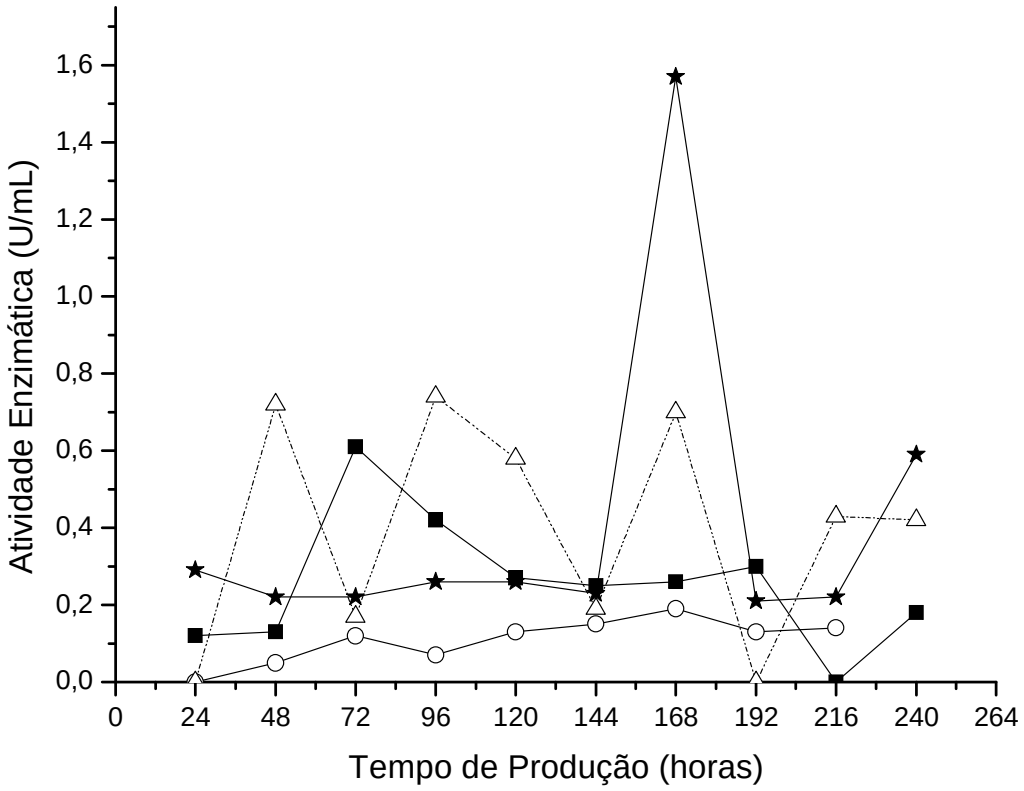


Figura 5A. Efeito de variáveis no meio nutriente descrito no item 3.4, usado durante o processo de fermentação submersa pelo *Rhizomucor pusillus*. (○) 1,0 g.L^{-1} de glicose, 8,0 g.L^{-1} Tween 80 e óleo de soja; (Δ) 1,0 g.L^{-1} glicose, 20,0 g.L^{-1} Tween 80 e óleo de soja; (◊) Ausência de glicose, 20,0 g.L^{-1} Tween 80 e óleo de soja; (■) Ausência de glicose, 8,0 g.L^{-1} Tween 80 e óleo de soja;

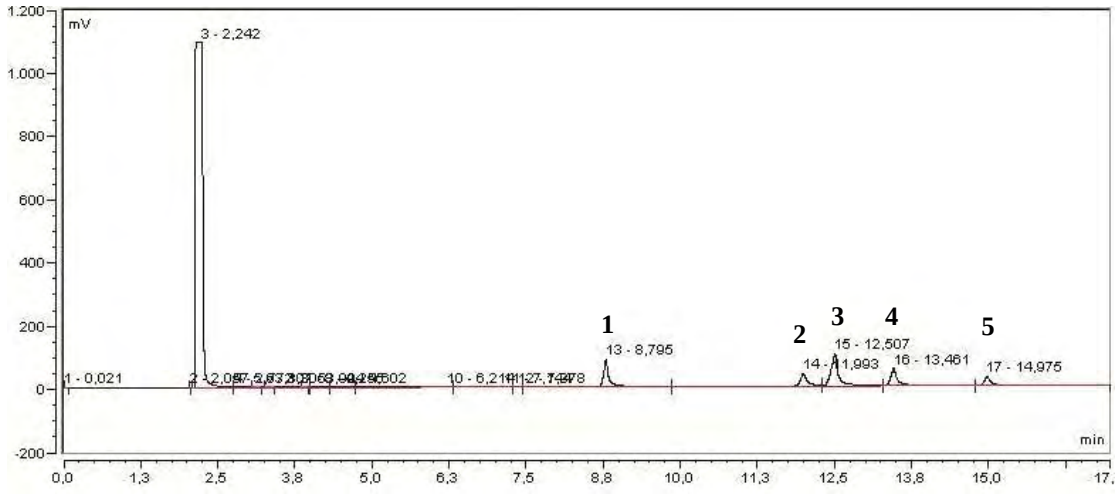


Figura 6A. Cromatograma ilustrando os tempos de retenção dos padrões nas condições ideais no cromatógrafo gasoso. 1. Etil palmitato: 8,75 min; 2. Etil estearato: 12,16 min; 3. Etil oleato:12,67 min; 4. Etil linoleato: 13,636 e 5. Etil linolenato 15,02 min.

APÊNDICE B:
Padronização de Metodologias

Padronização de metodologias

O trabalho com lipases é recente no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia aplicada, devido a isso foi necessário a padrozinação de algumas metodologias.

1. Quantificação de atividade de lipase

1.1 Efeito da variação dos componentes do ensaio na metodologia de quantificação da atividade hidrolítica de lipase

O método de quantificação da atividade de lipase proposto originalmente no projeto foi segundo Brush et al. (1999) com modificações: a solução de *p*-nitrofenil ester (substrato) a 2,5 mM foi dissolvido em 3% isopropanol e 2% de Triton X-100. A reação foi interrompida com acetona. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV visível Cary 100 Varian no comprimento de onda de 410 nm.

Seguindo esse método algumas variáveis foram analisadas:

1. Variação do solvente usado para dissolver o *p*-nitrofenil palmitato: água, isopropanol, hexano, tolueno.
2. Variação da concentração do solvente selecionado: 0,2 a 3%.
3. Variação do emulsificante adicionado ao tampão: Triton X-100, Tween 80, Tween 20, SDS (Dodecil sulfato de sódio) e ausência de surfactante.
4. Variação da concentração do surfactante selecionado: 1 a 4%.

A padronização da metodologia proposta por Brush et al. (1999) foi feita usando-se tampão Tris 0,1 M em pH 8,0. Para a padronização foi usada a lipase produzida por *Aspergillus* sp T4.6.2. Variou-se os tipos de surfactantes e solventes usados na solução do substrato *p*-nitrofenil palmitato. Verificou-se que o surfactante e o solvente orgânico que apresentaram melhores respostas foram triton X-100 e isopropanol, respectivamente.

A próxima etapa foi a variação da concentração de triton X-100, de 0,2 a 2% (Figura 1B) e de isopropanol de 1 a 4% (Figura 2B).

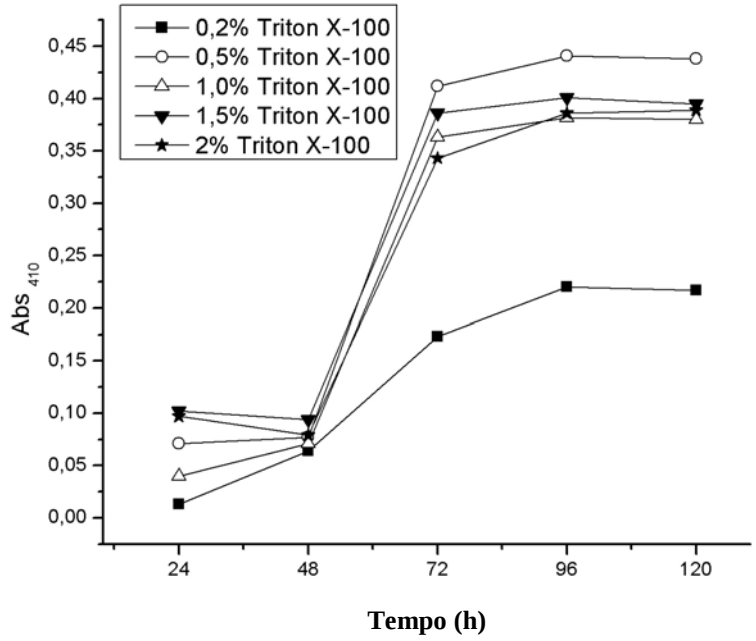


Figura 1B. Efeito da variação da concentração de Triton X-100 na atividade de lipase de *Aspergillus* sp T4.6.2.

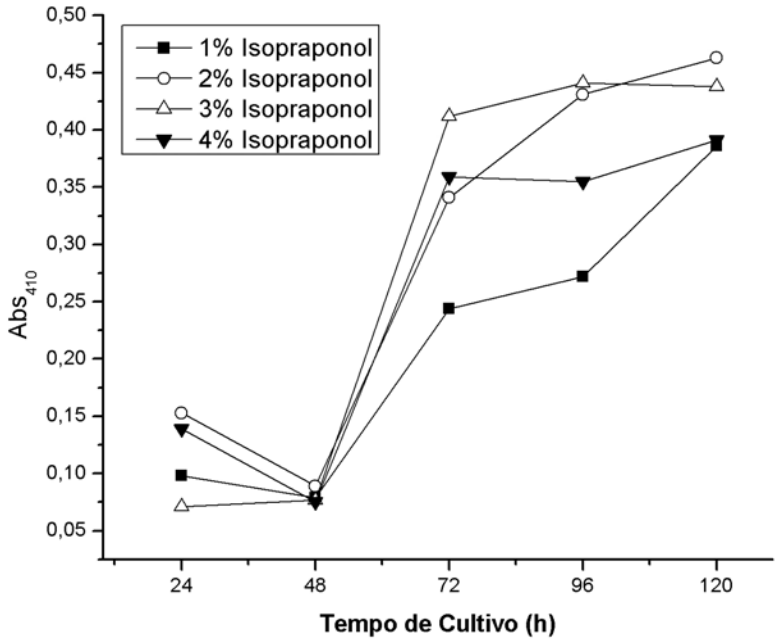


Figura 2B. Efeito da variação da concentração de isopropanol na atividade de lipase de *Aspergillus* sp T4.6.2.

As concentrações de 0,5% e 3% de Triton X-100 e isopropanol, respectivamente, foram as que apresentaram maior absorbância. Os resultados indicam que essas concentrações de emulsificante e solvente orgânico pouco interferiram na atividade da enzima. Assim, foi diminuída a concentração de surfactante em relação ao proposto pelo autor (BRUSH et al, 1999) e manteve-se a concentração de solvente.

O uso do Triton X-100 junto ao *p*-NPP é muito comum. Lin e Ko (2005) utilizaram 0,2% do detergente no ensaio, e verificaram que um aumento da concentração do mesmo causou inibição da atividade. Esses mesmos resultados foram encontrados em investigações de lipase de *Candida cylindracea* e *Penicillium* sp. (HELISTÖ, KOROELA, 1998).

1.2 Avaliação dos métodos propostos na quantificação da atividade hidrolítica de lipase

Outras metodologias de ensaio foram testadas, visto que embora tenha sido observado o crescimento dos fungos em meio contendo altas concentrações de óleo como fonte de carbono, a atividade observada foi baixa. Para avaliar se havia problemas na metodologia, outros dois métodos foram testados: o proposto por George et al. (1999) e o outro por Lima et al. (2004).

No método proposto por George et al. (1999), utilizou-se tampão Tris 25 mM pH 7, triton X-100 e goma arábica como surfactantes e *p*-nitrofenil palmitato a uma concentração de 0,1 mM. A reação foi incubada por 15 min a 45ºC e interrompida com Na_2CO_3 0,2M. Para o cálculo da atividade foi construída uma curva padrão com *p*-nitrofenil de onde se obteve o coeficiente da regressão linear, de 4,97 μMol/mL.

Na metodologia de Lima et al. (2004), o substrato (*p*-nitrofenil palmitato) foi usado em altas concentrações (8 mM), menor tempo de incubação (1 min) com tampão Fosfato de Sódio 0,05 M pH 7 e Triton X-100 e goma arábica como surfactantes.

Em todos os métodos a unidade de atividade enzimática (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberara 1 μMol de *p*-nitrofenil por min por mL de solução nas condições do ensaio.

Na figura 3B são mostradas as atividade obtidas por ambos os protocolos testados, utilizando-se enzimas obtidas pelo crescimento de *T. indicae-seudaticae* N31. Os dados obtidos com o método de Lima et al. (2004) apresentaram maiores valores de atividade, sendo o escolhido para prosseguir na quantificação das enzimas lipolíticas produzidas durante as fermentações.

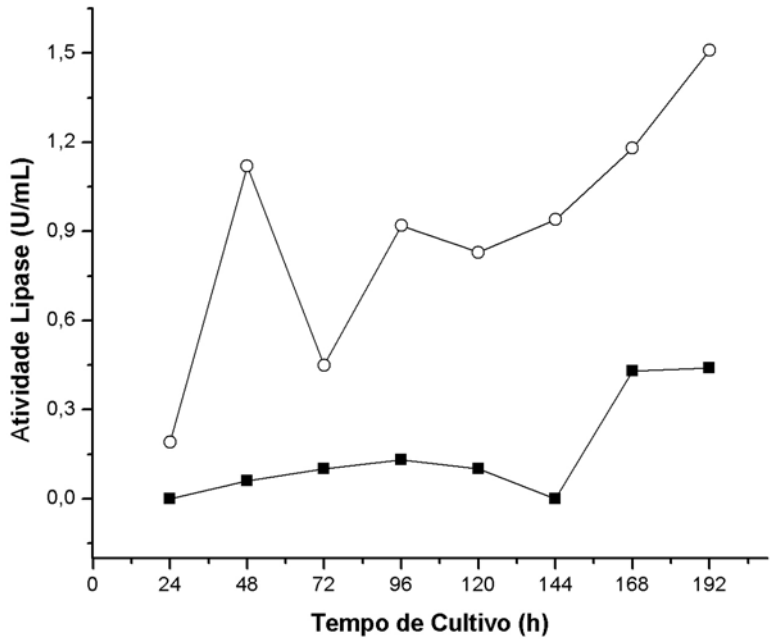


Figura 3B. Atividades de lipase obtidas por meio das duas metodologias avaliadas, utilizando-se as mesmas amostras de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. (○) Método proposto por Lima et al. (2004); (■) Método proposto por George et al. (1999).

2. Ensaios de transesterificação

2.1 Padronização dos primeiros ensaios de transesterificação e esterificação

As reações de transesterificação foram realizadas segundo o descrito na tabela 1B. Foram feitos dois controles, um positivo (utilizando uma enzima comercial com atividade transesterificante) e um negativo com a enzima a ser testada, porém inativa (autoclavada). Foram testadas enzimas em solução e enzimas liofilizadas.

Em intervalos fixos, alíquotas (500 µL) foram retiradas para o monitoramento do progresso da reação, foram diluídas em isopropanol e analisadas em HPLC de fase reversa conforme descrito abaixo. A fase móvel utilizada foi uma mistura de 1:1 de acetonitrila e metanol a um fluxo de 1 mL/min e a leitura foi realizada em 210 nm.

Tabela 1B. Apresenta a composição das reações de transesterificação testadas.

Variáveis	***Transesterificação***			***Esterificação***
	A	**B**	**C**	
Óleo	2,5g	4g	4 mL	4
Álcool	10g	2,22g	16 mL	2,22

Proporção	3:1	1:1	4:1	3:1
Volume Enzima	0,3 mL	0,2 mL	0,5g	0,2
Agitação	80 rpm	200 rpm	150rpm	150 rpm
Temperatura	45ºC	45ºC	45ºC	45ºC

As amostras foram separadas (sistema bifásico) e evaporadas com jato nitrogênio comprimido, para eliminação de resíduos de álcool e foram submetidas ao HPLC, conforme metodologia proposta por Türkan et al. (2006) e Fernandes et al., (2007).

A lipase de *T. indicae-seudaticae* N31 foi testada conforme indicado no item A da tabela 1. O cromatograma mostrado na figura 4B compara a reação de transesterificação realizada com a enzima analisada, os padrões e o controle (enzima inativa). O teste e o controle foram similares entre si e diferentes dos padrões, indicando que não houve transesterificação. As outras enzimas obtidas dos fungos *Aspergillus* sp T5.1.2, *Aspergillus* sp T4.6.1 e *Aspergillus* sp T4.6.2, selecionados na primeira etapa do trabalho também foram testadas, e apresentaram um perfil semelhante ao apresentado no cromatograma 3.

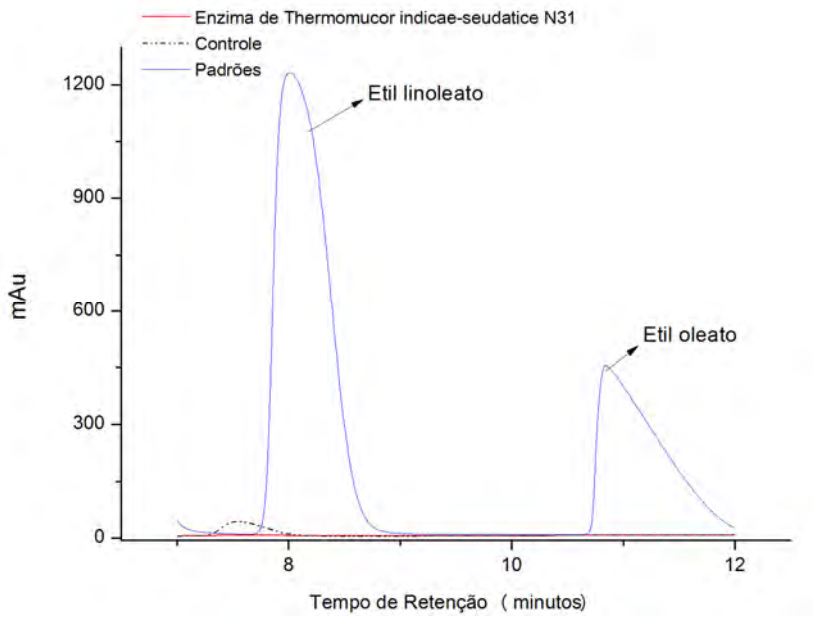


Figura 4B. Perfil obtido na análise do padrão de etil éster comparando-se com o controle e a amostra de *T. indicae-seudaticae* N31 submetidos à reação de transesterificação e analisadas em HPLC.

As enzimas liofilizadas dos fungos F1.5.1, F1.3.1, F2.2.4, F4.9.2 e *Rhizomucor pusillus* foram submetidas a transesterificação conforme indicado no item A da tabela 1. As lipases de T2.3 e F5.11 foram testadas de acordo com o item B e C da tabela 1, e as enzimas dos fungos F5.4, F5.7, F5.8 e F5.1.3 submetidas à reação segundo o item D e F da tabela 1.

Na figura 5B, notamos que não houve diferença entre a amostra contendo enzima ativa e o controle contendo enzima desnaturada, sendo estes diferentes dos padrões. Inferindo-se que não houve síntese de éster. O gráfico exemplifica a lipase de F5.1.3, mas o mesmo foi observado para todas as enzimas citadas: F1.5.1, F1.3.1, F2.2.4, F4.9.2 e *Rhizomucor pusillus.*

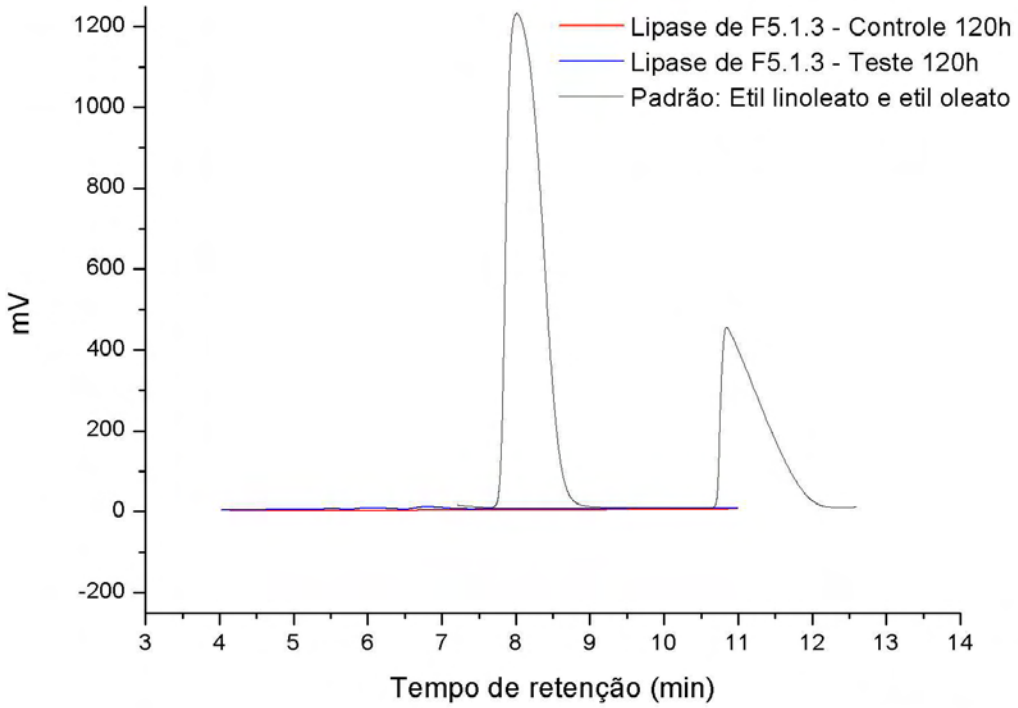


Figura 5B. Perfil apresentado comparando-se a amostra e controle da lipase de F5.1.3 com os padrões.

As enzimas dos fungos *Myceliophtora* sp F2.1.4, F2.1.3, F2.1.1 também foram testadas. Contudo, a lipase de *Myceliophtora* sp F2.1.4 e F2.1.1 apresentou o mesmo perfil observado na figura 5B. Algumas diferenças poderm ser observadas na figura 6B, que representa os testes realizados com a lipase de F2.1.3, no qual o controle não apresentou produção de ésteres, mas para a amostras de enzima ativa e liofilizada, observa-se picos indefinidos no mesmo tempo de retenção aos dos ésteres dos padrões,

podemos dizer que nesse caso houve a presença de traços de ésteres. Sugerimos que a enzima pode apresentar atividade transesterificante, mas as condições da reação podem não ter sido propícias para a produção dos ésteres.

Abigor et al. (2000) encontrou apenas traços de éster utilizando óleo de coco e metanol em um sistema livre de solvente, catalisando a reação com lipase comercial de *Pseudomonas cepacia.* Trocando-se o óleo de coco por óleo de palma nas mesmas condições de reação o autor observou 15% de produção de éster. A transesterificação para produção do biodiesel é uma simples mistura de compostos, no entanto, as peculiaridades que envolvem esses compostos e as condições em que essa reação é realizada podem ser fatores decisivos para o sucesso da mesma. Provavelmente se as técnicas e condições desse estudo forem refinadas e aprimoradas, transesterificações positivas e rentáveis poderão ser obtidas.

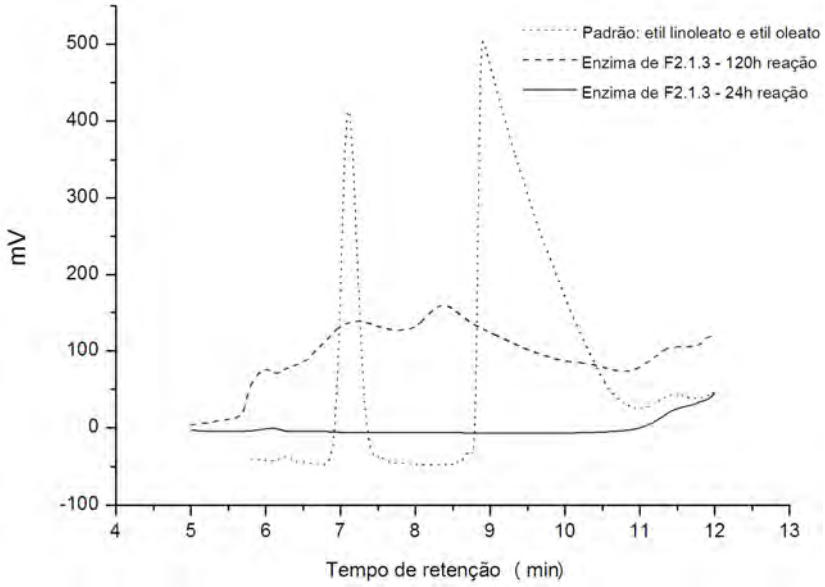


Figura 6B. Produtos formados em dois tempos de reação utilizando a enzima liofilizada de *Myceliophthora* sp F2.1.3 e a comparação com os padrões.

Poucas lipases encontradas mostram-se capazes de uma eficiente síntese de biodiesel e somente algumas delas são capazes de catalisar a reação em ambos sistemas: sistema livre de solvente orgânico e em sistema com solvente orgânico. A maioria das enzimas utilizadas são preparações de enzimas comerciais (ANTCZAK et al., 2009).

Para a padronização da metodologia da reação de transesterificação e averiguação de sua veracidade, foram realizados os mesmos testes de transesterificação com uma enzima comercial de *Rhizomucor miehei*, cedida pelo Prof. Dr. Geraldo Nery.

Observa-se na figura 7B que os picos obtidos foram eluídos em tempo de retenção próximo ao dos padrões etílicos, podemos observar que quanto maior o tempo de reação maior o pico formado, indicando que a quantidade de ésteres formados aumenta com o tempo. A taxa de conversão obtida para a enzima em 48h de reação foi de 61%, e em 72h foi de 94%.

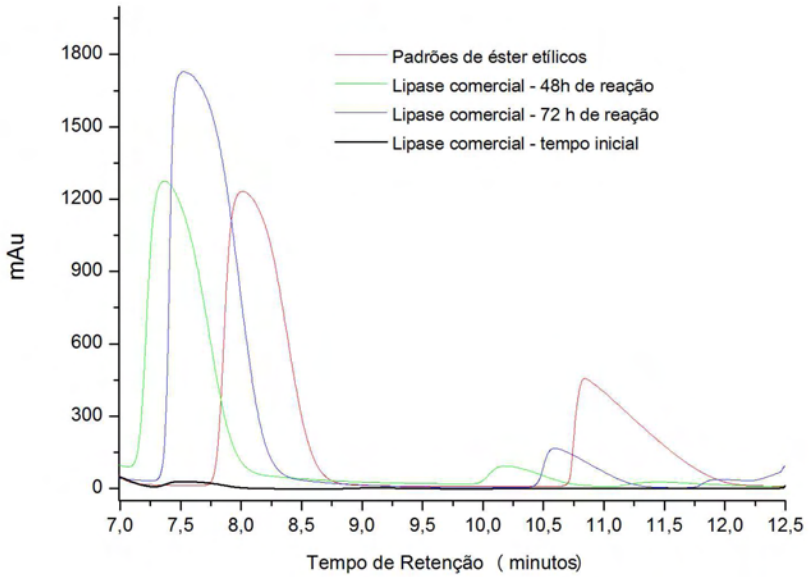


Figura 7B. Perfil obtido na análise do padrão de etil éster comparando-se com vários tempos de reação da transesterificação utilizando-se a enzima Comercial de *Rhizomucor miehei*.

Yagiz et al. (2007) observou o aumento da taxa de conversão de metil éster pelo o tempo de incubação através da atuação da Lipzyme-TL IM (Lipase comercial de *Thermomyces lanuginosus*), sendo que, após 70 horas de reação ocorreu cerca de 40% de conversão e após 105h, 95% de conversão dos ésteres. Shah et al. (2006) também demostrou a variação do tempo na etanólise. A taxa de conversão aumenta com o tempo e a partir de 15 h de reação, a taxa de conversão se mantém constante em torno de 70%, para enzima de *Pseudomonas cepacia* livre e imobilizada. Fernandes et al. (2007) relataram 97,4% de éster etílico na presença do extrato bruto enzimático produzido em fermentação em estado sólido por *Burkholderia cepacia*. Utilizando-se a enzima

comercil e imobilizada de *Pseudomonas fluorescens* observou-se 91% de conversão de etil éster em apenas 8h de reação (SALIS et al., 2009).

2.2 Padronização da transesterificação de lipases imobilizadas

Todas as análises descritas nesse item foram realizadas na Escola de Engenharia de Lorena (USP), sob a supervisão e colaboração da Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro e de seus alunos.

Imobilização em quitosana

A quitosana foi dissolvida em ácido acético a 1% e em seguida foi precipitada em meio alcalino. Utilizando seringa e agulha, a solução em meio ácido foi gotejada em solução de NaOH 1 mol.L-1 (Figura 8B) e mantida sob agitação suave por 24 horas (CHIOU e WU, 2004). As microesferas gelificadas foram lavadas com água destilada e submetidas à ativação com uma solução de 1% de glutaraldeído (ADRIANO et al., 2008).

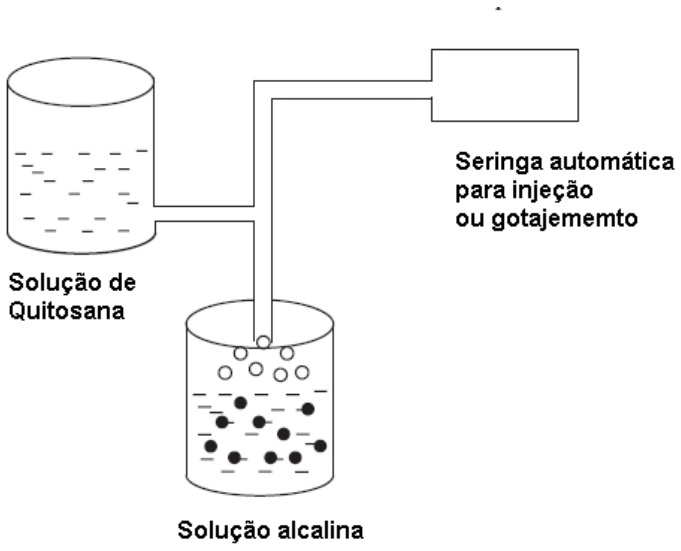


Figura 8B. Representação esquemática da preparação de microesferas de quitosana por precipitação em meio alcalino.

Depois de ativadas, as esferas foram lavadas com água ultrapura e adicionadas a uma solução contendo a enzima, para que ocorresse a ligação da enzima com as mesmas, sendo mantidas por 3 horas a 4 ºC. Em seguida, as esferas foram lavadas com água destilada para retirada da enzima não imobilizada.

PHB (poli-hidroxibutirato)

O PHB adquirido já no formato de esferas foi pré-tratado com álcool etílico, as esferas ficaram imersas no solvente por 3 horas. Depois foi filtrado a vácuo e seco para retirada completa do solvente. Para cada 50 mL de solução de extrato enzimático bruto foram usados 5g de PHB. A mistura, PHB e enzima, foi mantida sob agitação por 24 horas. Após esse período também foi filtrado a vácuo e submetido às análises.

As lipases dos fungos melhores produtores escolhidos durante as etapas de seleção do trabalho (capítulo 2 e 3) foram imobilizadas em PHB e quitosana, visando concentrar a atividade enzimática. Os imobilizados foram secos, na tentativa de eliminar a água para possível aplicação na transesterificação. A água pode afetar esse tipo de reação, pois interfere no equílibrio químico da reação podendo mudar a rota da transesterificação para a hidrólise. Por isso é muito importante trabalhar com níveis reduzidos de água na transesterificação (TAN et al., 2010).

Esses experimentos foram realizados na Escola de Engenharia de Lorena (USP) sob a supervisão da Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro. Após os testes de imobilização, reações de transesterificação foram realizadas. Os fungos testados foram: *Myceliphtora* sp F2.14, *Myceliphtora* sp M7.7, F2.1.3, F2.1.1 todos produzidos em FES, e *T. indicae-seudaticae* N31 produzido em FES e FSm.

As enzimas foram imobilizadas em dois tipos de suporte: esferas de quitosana, e esferas de PHB (poli-hidroxibutirato). Após a imobilização foi feita a secagem do material imobilizado em uma bomba de auto-vácuo, e a umidade foi medida antes e após o processo de secagem. As atividades foram feitas pelo método de titulação (descrito em 4.1) pela hidrólise de óleo de oliva e incubados por 30 min a 37ºC e 150 rpm de agitação.

De acordo com as tabelas 2B e 3B, podemos observar que para alguns fungos, a imobilização foi eficiente quando analisamos a diferença entre a atividade inicial e a atividade da solução resultante, que é a solução enzimática sobrenadante após imobilização. Em *Myceliophtora* sp F2.1.4 e *Myceliophthora* sp F2.13, 64 e 66% da enzima foi ligada na quitosana, respectivamente, e 80 e 82% respectivamente, para o PHB. Para esses fungos a imobilização apresentou um bom rendimento em PHB. Para *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, 51 (FSm) e 25% (FES) da enzima testada ligou-se na quitosana. A lipase de *Myceliophtora* sp M7.7 apenas 2,5% se ligou ao suporte e

para *Myceliophthora* sp F2.1.1, 64% se ligou à quitosana. Os resultados mais eficientes foram para *Myceliophthora* sp F2.1.4 e F2.13 utilizando PHB.

Tabela 2B. Ilustra as lipases imobilizadas em PHB (polihidroxibutirato) e quitosana (Q), indicando as atividades iniciais e as medidas de umidade, antes e após secagem.

Enzima	***Atividade incial***	***Massa úmida inicial (%)***	***Massa úmida final (%)***
Myceliophthora sp F2.1.3	2,35 U/mL	Q - 90 PHB - 66	Q -8,3 PHB - 4,8
Myceliophthora sp F2.1.4	2,62 U/mL	Q - 91 PHB - 68	Q -30 PHB -6,5
Thermomucor Indicae-seudaticae (FS)	5,46 U/mL	66	7
Myceliophthora sp F2.1.1	1,58 U/mL	68	8
Myceliophthora sp M7.7	1,19 U/mL	72	
Thermomucor Indicae-seudaticae (FES)	3,54 U/mL	71	8,8
Myceliophthora sp F2.1.1 (Liofilizado)	57,1 U/g	97	20

Tabela 3B. Ilustra as lipases imobilizadas em PHB (poli-hidroxibutirato) e quitosana, indicando as atividades do imobilizado úmido, do imobilizado após secagem e da solução resultante após a imobilização.

Enzima	***Imobilização PHB***			***Imobilização Quitosana***		
	Imobilizado úmido	**Imobilizado seco**	**Solução Resultante**	**Imobilizado úmido**	**Imobilizado seco**	**Solução Resultante**
Myceliophthora sp F2.1.3	7,4 U/g	29 U/g	0,8 U/mL	6,34 U/g	12,1 U/g	0,47 U/mL
Myceliophtora sp F2.1.4	5,94 U/g	2,28 U/g	0,94 U/mL	16,5 U/g	56,67 U/g	0,46 U/mL
Thermomucor indicae-seudaticae N31 (FS)	2,46 U/g	1,4 U/g	2,66 U/mL	--------	--------	--------
Myceliophthora sp F2.1.1	4,17 U/g	7,94 U/g	0,56 U/mL	--------	--------	--------
Myceliophtora sp M7.7	14,58 U/g	43,2 U/g	1,16 U/mL	--------	--------	--------
Thermomucor indicae-seudaticae N31 (FES)	6,60 U/g	7,13 U/g	2,64 U/mL	--------	--------	--------
Myceliophthora sp F2.1.1 (Liofilizado)	--------	--------	--------	57,1 U/g	41 U/g	--------

Após a secagem das esferas todas as enzimas imobilizadas foram usadas em reação de transesterificação com óleo de babaçu e álcool etílico em uma razão molar 1:6

(descrito em 4.2). As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa, mas apenas *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 apresentou traços de produção de éster.

Apesar de não obtermos um resultado positivo, essas análises foram importantes para o aprendizado da metodologia de imobilização e de transesterificação.

3. Padronização da metodologia do HPLC

3.1 HPLC de Fase Reversa

A quantificação dos ésteres dos primeiros ensaios de transesterificação (descritos em 2.1) foi feita em HPLC de fase reversa. (Gilson com detector UV-Visível) em coluna C18 (250 x 4,6 mm). Os ésteres produzidos foram quantificados com base na curva de calibração usando etil oleato e linoleato (FERNANDES et al., 2007; FU et al., 2008). A fase móvel foi utilizada a um fluxo de 1 mL/min e a leitura foi em 210 nm. A cada 24h uma alíquota de 500µL foi retirada e diluída em isopropanol para análise em HPLC.

Várias fases móveis foram testadas, na tentativa de se obter uma maior resolução dos cromatogramas. Os testes foram baseados e modificados segundo Fu et al. (2008), Holcapek et al. (1999), Di Nicola et al. (2008) e Zanotto et al., 2009. O equipamento utilizado possui duas bombas, sendo necessário o uso de dois solventes diferentes para a formação de um gradiente, um na bomba A e outro na bomba B, conforme descrito abaixo:

- **Teste 1:** A: Acetonitrila 100%; B: Acetonitrila 30%:Metanol 70%
- **Teste 2:** A: Acetonitrila 100%; B: Água ultrapura 100%
- **Teste 3 -** A: Acetonitrila 100%; B: Hexano 30%:Isopropanol 70%
- **Teste 4:** A: Acetonitrila 100%; B: Metanol 100%

A padronização da metodologia de HPLC foi realizada no início da segunda etapa do trabalho, quando ainda não havíamos recebido alíquota da lipase comercial de *Rhizomucor miehei*, cedida pelo Prof. Dr. Geraldo Nery. Desse modo, os testes foram realizados utilizando o padrão etil oleato.

Na figura 9B verificou-se que somente o pico apresentado no teste 3 não apresentou boa resolução, mas ao se avaliar os tempos de retenção decidiu-se por utilizar o método aplicado no teste 4, pois apresentou resultados similares aos

encontrados por Fu et al. (2008) e Di Nicola et al. (2008), no qual o tempo de retenção foi próximo a 8,8 min.

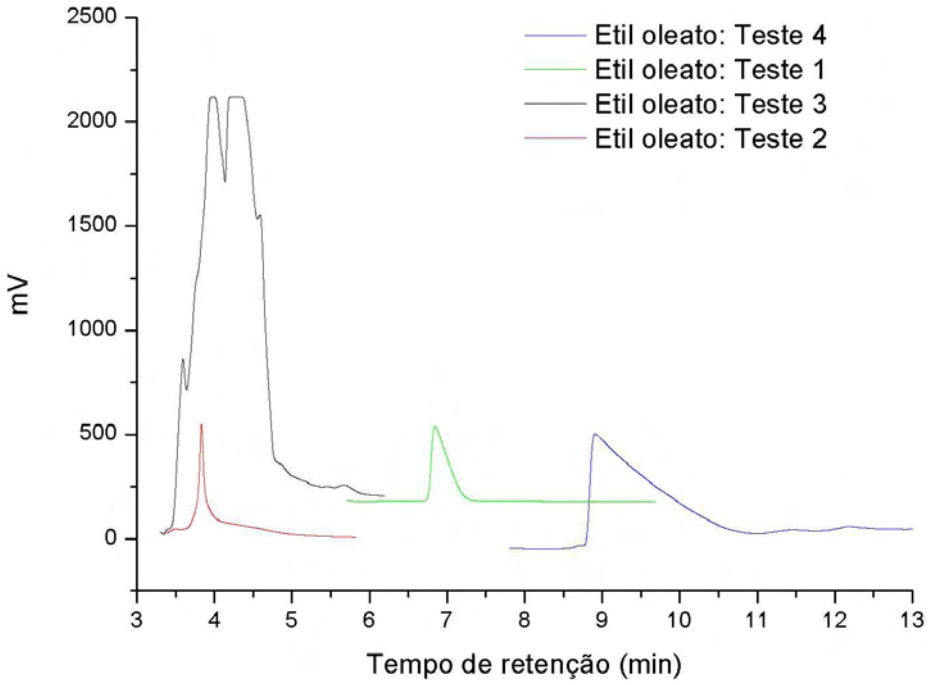


Figura 9B. Teste realizado para escolha do solvente, etil oleato foi usado como padrão.

Depois de selecionados os solventes, o gradiente foi refinado e as seguintes condições foram padronizadas:

Tabela 4B. Protocolo de corrida do HPLC de fase reversa.

TEMPO (minutos)	**AÇÃO**
0	100% Acetonitrila
6	Inicio do gradiente: 100% Acetonitrila
20	Fim do gradiente: 100% Metanol
27	100% Metanol
34	Solvente inicial: 100% Acetonitrila
40	Fim da corrida
Fluxo	1mL/min

Para avaliarem-se as amostras submetidas à transesterificação, os cromatogramas das amostras foram comparados aos dos padrões etil linoleato e etil oleato que são derivados dos ácidos graxos de maior concentração no óleo de soja (HOLCAPEK et al.,1999; WEST, 1987):

Para os cálculos da quantificação de éster foram feitas curvas de calibração de dois padrões, etil oleato e etil linoleato, pois são os ácidos graxos de maior concentração do óleo de soja. Nos cálculos do rendimento da transesterificação, a equação da regressão linear (1) foi usada para calcular a concentração do éster formado, no qual Y é a área do pico do éster formado, A e B os valores obtidos pela curva de calibração e X a concentração do éster produzido:

$$Y = A + B.X \quad (1)$$

Sabendo-se a concentração do éster formado e a concentração do óleo usado, foi calculada a porcentagem de conversão em éster por uma regra de três simples.

3.2 Método de quantificação da atividade de transesterificação por HPLC

Esse método foi desenvolvido pela Amano Enzyme (Empresa especializado no desenvolvimento de enzimas) e nos foi cedido pela Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro. A reação foi realizada misturando-se 0,6 mL de 1-feniletil álcool com 2,4 mL de acetato de vinila e 20 mg de cada enzima comercial testada. A mistura foi mantida sob agitação a 25ºC por 20 min. Uma alíquata de 100 µL foi retirada e adicionada a 600 µL de isopropil éter e analisada em HPLC. Essa padronização foi feita, na tentativa de se obter uma metodologia de pré-seleção de lipases transesterificantes durante a seleção de fungos produtores de lipase.

Para análise foi utilizada uma coluna C18 (ODS) e fase móvel foi de 42% de acetonitrila:58% de água ultrapura (isocrático). A detecção ocorreu a 254 nm. O equipamento utilizado foi um HPLC Jasco, bomba Jasco PU-980 e detector Jasco UV-975, cedido pelo Prof. Dr. Mauricio Boscolo.

Foram testadas quatro enzimas comerciais, Novozyme 435 da Novozyme, *Candida rugosa*, *Rhizomudor miehei* e *Thermomyces lanuginosus* adquiridas da Sigma-Aldrich.

A figura 10B representa o perfil do cromatograma encontrado para o controle (na ausência do catalizador), mostrando a presença de dois picos sendo o primeiro

(tempo de retenção por volta 10 min) com presença de platô indicando alta concentração da amostra. Na figura 11B podemos observar o aparecimento de um novo pico em 6 min e uma diminuição do pico em 10 min, ao qual havia apresentado um platô no controle, e sugere a formação de outros produtos que aparecem a partir de 16 min.

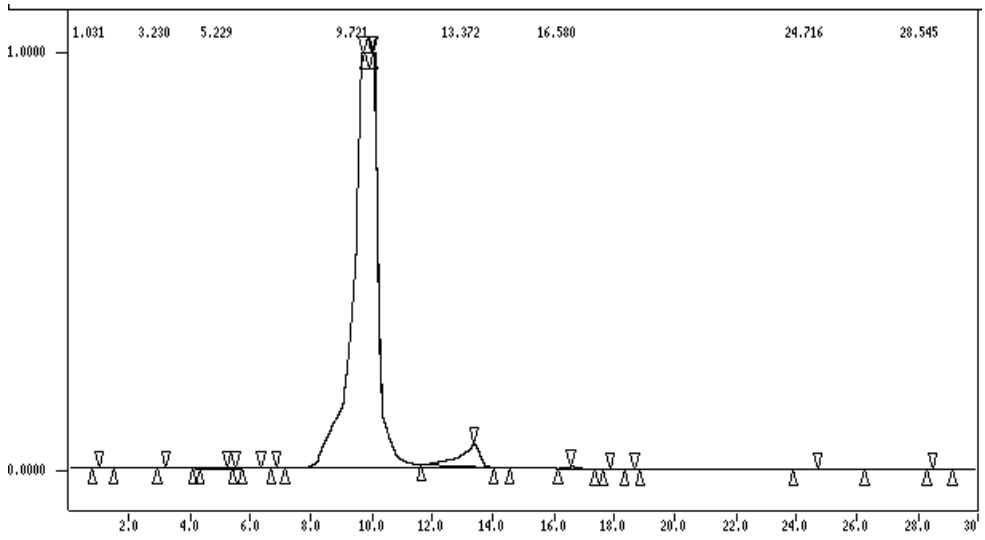


Figura 10B. Cromatograma correspondente ao controle da reação.

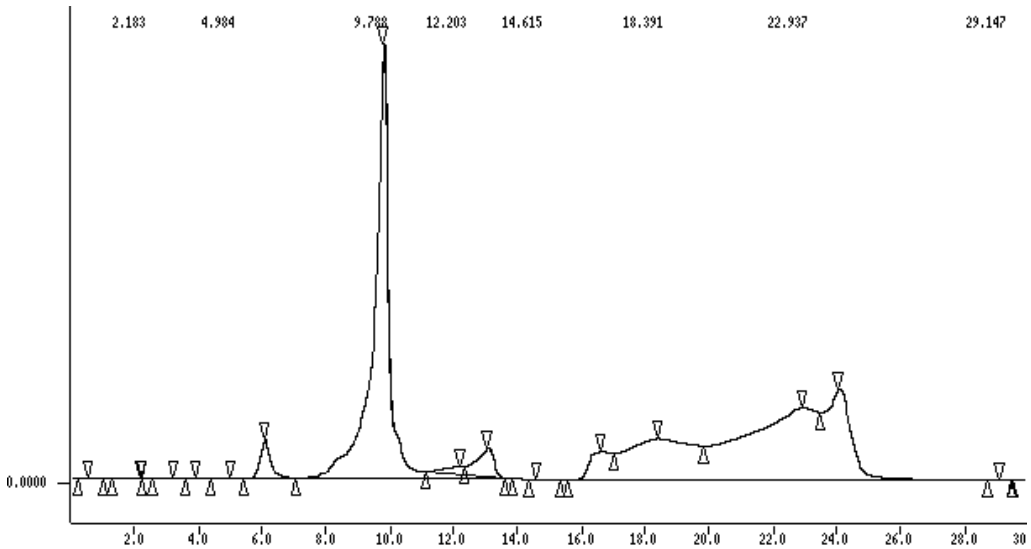


Figura 11B. Cromatograma correspondente à reação com a Novozyme 435, como catalisador.

Nas figuras de 12B-14B, estão representados as reações realizadas com as enzimas de *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei* e *Thermomyces lanuginosus*. Nestes casos, a enzima não atuou sobre os reagentes, pois os cromatogramas estão iguais aos do controle. Foi quantificada a atividade esterificante dessas enzimas seguindo o

método descrito em 4.3, e foi obtido 850,67 U/g de esterificação utilizando-se o ácido oléico para a Novozyme 435, e 15,47 U/g para a enzima de *Rhizomucor miehei*. Estes dados sugerem que a metodologia em questão é viável para enzimas com alto poder de esterificação. Enzimas com atuação mediana não são quantificadas. Desse modo, essa metodologia foi considerada inadequada para os nossos objetivos.

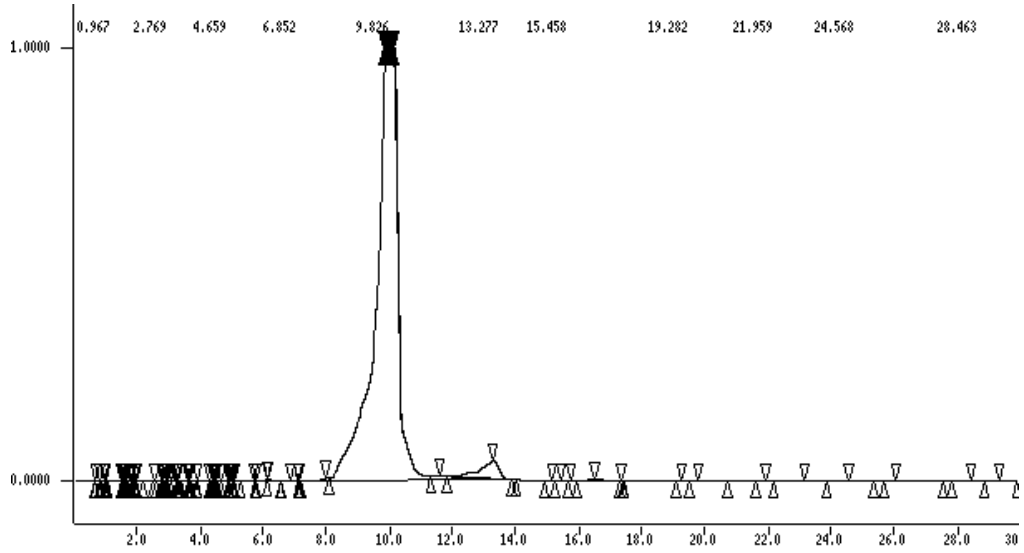


Figura 12B. Cromatograma correspondente a reação com a enzima de *Candida rugosa* como catalisador.

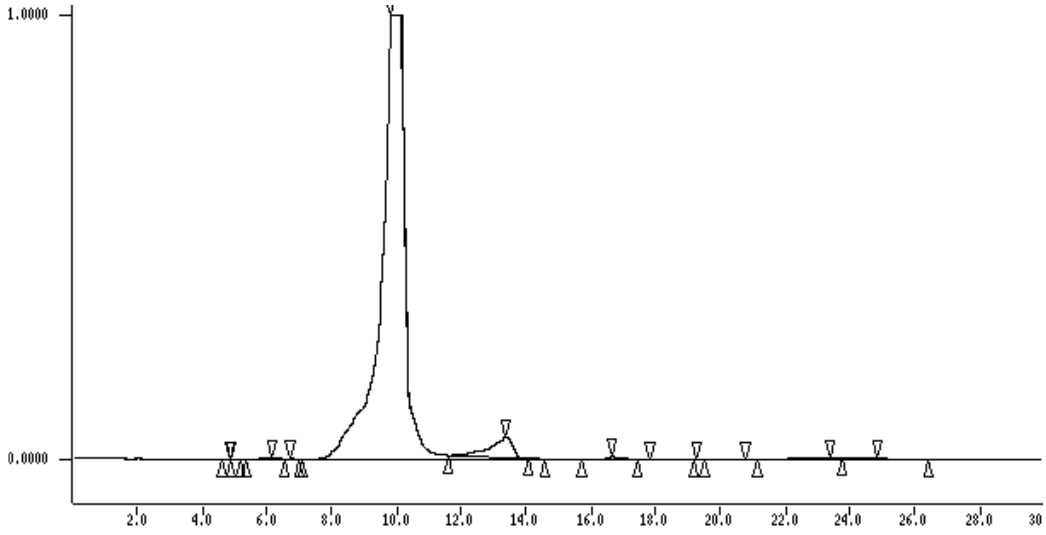


Figura 13B. Cromatograma correspondente a reação com a enzima de *Rhizomucor miehei* como catalisador.

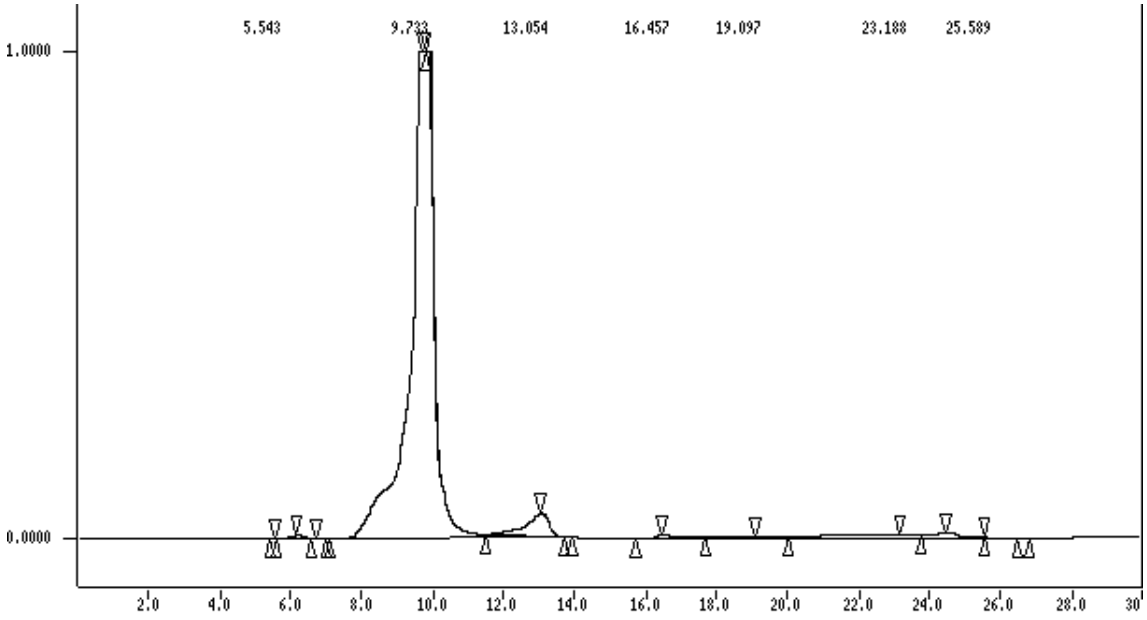


Figura 14B. Cromatograma correspondente a reação com a enzima de pâncreas de porco como catalisador.

4. OUTRAS METODOLOGIAS

4.1 Quantificação da atividade hidrolítica de lipase por titulometria

Para a quantificação da atividade por hidrólise de óleos foi utilizada a titulometria. Em erlenmeyer de 50 mL, foram pesados 0,09g de goma arábica que foi dissolvida em 3 mL de água destilada e 4 mL de tampão fosfato 0,05M pH 7, 1 mL de óleo de oliva foram adicionados ao meio reacional. A reação foi incubada à 45ºC por 30 min.

Após a incubação, a reação foi parada com acetona:álcool etílico (1:1) e titulada com KOH 0,05 M padronizado, usando fenolftaleína 0,001% como indicador ácido-base.

Para cálculo da atividade:

$$A = \frac{(V_{KOH\ amostra} - V_{KOH\ controle}) x M x 1000}{m_{amostra} \times tempo}$$

Onde:

$V_{KOH\ amostra}$: volume de base titulada na amostra,

$V_{KOH\ controle}$: volume de base titulada no controle,

M: molaridade de KOH usada (0,05M),

$m_{amostra}$: massa seca da amostra usada na reação (g),

Tempo de incubação: 30 min.

A atividade é expressa em U/g, que é definida como quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de ácido graxo por minuto por grama de proteína, nas condições do ensaio.

4.2 Reação de Transesterificação

Para o ensaio padrão de transesterificação foi utilizado óleo de babaçu e álcool etílico 99%, com razão molar 1:6 (óleo:álcool) e 10% de catalisador (enzima livre ou imobilizada) em relação ao meio reacional, totalizando 10g de meio reacional, e mantidos sob agitação de 150 rpm. A temperatura da reação foi de 45ºC, e foi utilizado tert-butanol, a uma razão 1:1,5 (óleo:solvente) como solvente na reação. Esse método foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro, da Escola de Engenharia da USP em Lorena-SP. O tempo de incubação variou de 24 a 120 horas, e uma alíquota de 500 µl foi retirada a cada 24h e analisada por Cromatografia Gasosa (CG).

4.3 Reação de Esterificação

O ensaio de esterificação foi realizado empregando-se a metodologia proposta por Langone et al. (1999) e Bernardes et al. (2007). Foi adicionado a 0,1 g enzima liofilizada os substratos reacionais na proporção molar de 1:2 ácido oléico/etanol. A mistura foi incubada por 40 minutos a 40 °C sob agitação de 150 rpm. Após a incubação, foi retiradas alíquotas (triplicata) de 300 µL e a reação foi interrompida pela adição de 20 mL de uma solução de acetona/etanol 1:1 (v/v). Os ácidos graxos não consumidos na reação foram titulados até pH 11,0 com solução de NaOH 0,02 N. As dosagens de atividade de esterificação de lipase será definida como a quantidade de enzima necessária para consumir 1 µmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas, determinada por meio da Equação.

$$\text{Atividade de esterificação (U/mL)} = \frac{(Vb - Va).N.1000.Vt}{t.\ V_{al}.V_{am}}$$

onde:

Va: volume de NaOH gasto na titulação da amostra

Vb: volume de NaOH gasto na titulação do branco

N: Normalidade da solução de NaOH padronizada

Vt: volume reacional total (5,6 mL)

t: tempo de reação (40 minutos)

V_{al}: volume da alíquota (0,3 mL)

V_{am}: volume de extrato enzimático equivalente á massa de extrato liofilizado

5. REFERÊNCIAS

ABIGOR, R. D. et al. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerium lauric oils. **Biochemical Society Transactions**, v. 28, part 6, p. 979-981, 2000.

ANTCZAK, M. S. et al. Enzymatic biodiesel synthesis: Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy,** v. 34, p. 11-85-1194, 2009.

ADRIANO, W. S. et al. Improving the Properties of Chitosan as Support for the Covalent Multipoint Immobilization of Chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v. *9*, *p.* 2170–2179. 2008.

BERNARDES, O.L. et al. Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized Lipase**. Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, p. 105-114, 2007.

BRUSH, T. S. et al. Purification and characterization of extracellular lipases from *Ophiostoma piliferum*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 2131-2138, 1999.

CHIOU, S-H. ; WU, W-T Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, v. 25, p. 197–204. 2004.

DI NICOLA, G. et al. Development and optimization of a method for analyzing biodiesel mixtures with non-aqueous reversed phase liquid chromatography. **Journal Chromatography A**, v. 1190, p. 120-126, 2008.

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

FU, Y. J. et al. Determination of fatty acid methyl esters in biodiesel produced from yellow horn oil by LC. **Chromatographia**, v. 67, p. 9-14, 2008.

GEORGE E. et al. Influence of growth medium composition on the lipolytic enzyme activity of *Ophiostoma piliferum* (CartapipTM). **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, p. 137-140, 1999.

HELISTÖ P., KOROELA, T. Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 113–117, (1998).

HOLCAPEK, M. et al. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. **Journal of Chromatography A**, v. 858, p. 13-31, 1999.

LANGONE, M.A.P.; SAN'ANNA JR, G.L. Enzymatic syntesis of medium-chain tryglicerides in a solvent-free system. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, p. 759-770, 1999.

LIMA, V. M.G. et al. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 31, p. 53-61, 2004.

LIN, E.S.; Ko, H. C. Glucose stimulates production of the alkaline-thermostable lipase of the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 261-265, 2005.

SALIS, A. et al. Role of the support surface on the loading and the activity of *Pseudomonas fluorescens* lipase used for biodiesel sinthesys. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzimatic**, v. 57, p. 262-269, 2009.

SHAH, S., GUPTA, M. N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. **Process Biochemistry**, 2006.

TAN, T. et al. Biodiesel production with immobilized lipase: a review. **Biotechnology Advances**, *in press* 2010.

TÜRKAN, A.; KALAY, S. Monitoring lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography: elucidation of the mechanisms of lipases. **Journal of Chromatography A**, 2006.

WEST, R. C. **Handbook of data on organic compounds**. Boca Raton: CRC Press, v. 2, 1987.

YAGIZ, F., KAZAN, D., AKIN, A. N. Biodiesel production using from waste oils by using lipase immobilized on hidrotalcite and zeolites. **Chemical Engineering Journal**, v. 134, p. 262-267, 2007.

ZANOTTO et al. Potential application in biocatalysis of mycelium-bound lipases from Amazonian Fungi. **Journal of Brazilian Chemical Society**, p. 1-14, 2009.