



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO EM QUÍMICA

GLÊYDISON AMARANTE SOARES

**SÍNTESE DE ÉSTERES CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO POR
Penicillium roqueforti ATCC 10110 COMPARADA À LIPASE COMERCIAL DE
Candida rugosa IMOBILIZADA EM ACCUREL MP 1000**

ILHÉUS
2018

GLÉYDISON AMARANTE SOARES

**SÍNTESE DE ÉSTERES CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO POR
Penicillium roqueforti ATCC 10110 COMPARADA À LIPASE COMERCIAL DE
Candida rugosa IMOBILIZADA EM ACCUREL MP 1000**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Franco

Coorientadora: Profa. Dra. Julieta Rangel de Oliveira

ILHÉUS

2018

S676

Soares, Glêydison Amarante.

Síntese de ésteres catalisada por sólido fermentado por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 comparada à lipase comercial de *Cândida rugosa* imobilizada em accurel MP 1000 / Glêydison Amarante Soares. – Ilhéus, BA: UESC, 2018.

91f. : il.

Orientador: Marcelo Franco.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências.

1. Fermentação. 2. Lipase. 3. Cândida. 4. Esterificação. 5. Biodiesel. I. Título.

CDD 547.29

GLÉYDISON AMARANTE SOARES

SÍNTESE DE ÉSTERES CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO POR
(*Penicillium roqueforti*) ATCC 10110 COMPARADA À LIPASE COMERCIAL DE
(*Candida rugosa*) IMOBILIZADA EM ACCUREL MP 1000

Ilhéus-BA, 06 de julho de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof(a). Dr. Marcelo Franco
Doutor em Química - UFRJ
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC
Orientador(a)



Prof(a). Dr. Robson Carlos Alnoch (UFPR)
Doutor em Ciências Bioquímicas - UFPR
Universidade Federal do Paraná - UFPR



Prof(a). Dr. Janclei Pereira Coutinho (UESC)
Doutor em Ciência de Alimentos (UNICAMP)
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Sua infinita graça e misericórdia, que me sustentaram e me conduziram por caminhos pacíficos, mesmo em momentos de tribulação;

Aos meus pais, Fernando e Gilvanete, e aos meus irmãos, Alysso e Beatriz, pelo amor e carinho que me ajudaram a chegar até aqui;

A toda minha família, pelo imenso amor e apoio;

Ao meu orientador, Marcelo Franco, pela confiança, orientação e acreditar em mim mais até do que eu poderia fazê-lo;

À professora Julieta, pela coorientação, confiança e oportunidade;

Às professoras Andréa e Elizama, pelas contribuições e sugestões na banca de qualificação;

À professora Nadia Krieger, pela oportunidade e confiança ao me aceitar e orientar no estágio de mobilidade, o qual foi de elevada importância para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos amigos da República Itabuna, Tati, Ane, Analu, Lua, Marcos, Peu, e Lucas, pelos momentos de alegria e bastante comilança;

Aos meus colegas do mestrado, Deisy, Carol, Adriana, Fernanda, Marina, Sêmele, Cayo e Pedro, e aos meus colegas e amigos do laboratório (LaBioCat) mais top que existe, Polly, Nadabe, Aila, Alê, Tati, Cíntia, Nájila, Franci, Zana, Maiara, Mariana, Thalita, Adriana, José, Lucão, Márcio, Cleub, Edvan, George e Gilmar, pelos momentos de alegria e discussões. Obrigado galera! Vocês foram massa demais;

A todos do LTEB, em especial a Glauco, Robson, Leandro e Maura, pela amizade, contribuição e ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho;

Aos membros do grupo Barraco, Ane, Lua e Natan, pelos momentos de risadas;

Aos professores do PPGQUIM, em especial, a Jancei, Raildo e Rosilene, pelo conhecimento transmitido que contribuiu para minha formação e redação deste trabalho;

À UESC (PPGQUIM) e à UFPR (PPGQ), pela oportunidade e todo apoio concedido durante a realização desse trabalho.

À FAPESB, pela bolsa de mestrado e à CAPES, pelo auxílio financeiro durante o Estágio de Mobilidade em Curitiba;

Aos membros da banca, por aceitarem o convite;

A todos que contribuíram de alguma forma com este trabalho.

“Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o conforme as tuas forças, porque na sepultura, para onde tu vais, não há obra nem projeto, nem conhecimento, nem sabedoria alguma.” (Eclesiastes 9:10)

SOARES, G. A. **Síntese de ésteres catalisada pelo sólido fermentado por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 comparada à lipase comercial de *Candida rugosa* imobilizada em Accurel MP 1000**. 2018. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Santa Cruz, 2018.

RESUMO

No presente trabalho, foi investigada a influência de três meios de cultivo em FES para produção de lipase por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 e posterior otimização da FES. Os meios de cultivos foram: A – bagaço de cana, óleo de soja e solução nutriente; B – bagaço de cana com farelo de cacau, óleo de soja e solução nutriente; C – farelo de cacau, óleo de soja e solução nutriente; e D – farelo de cacau sem suplementação. A maior atividade de hidrólise de lipase, utilizando azeite de oliva como substrato, foi obtida com o meio A, no qual a atividade foi 62% maior que a obtida no meio D. Após prévia determinação, o óleo de dendê de fritura foi empregado como fonte de carbono e indutor para o estudo de otimização, o qual foi realizado usando metodologia de superfície de resposta e as variáveis umidade inicial do substrato (UI) e fonte de carbono e indutor (FC&I). A maior atividade lipolítica ($52,5 \pm 4,9 \text{ U g}^{-1}\text{SS}$, a qual foi 13% maior do que a condição não otimizada) foi obtida com UI e FC&I de 80 e 23% (m m^{-1}), respectivamente. Investigou-se, também, no presente estudo a influência de três suportes (Accurel MP 1000, Immobead-150 e Sepabeads FP-BU) na imobilização de lipase de *Candida rugosa* com o propósito de avaliar as diferentes formas de interação entre a enzima e os suportes empregados. A eficiência (E) e retenção da atividade (R) foram avaliados como parâmetros cruciais na verificação do processo. A retenção da atividade foi superior quando se empregou a lipase imobilizada em Accurel MP 1000, onde os valores de R foram superiores a 200%. Nesse sentido, o suporte Accurel MP 1000 apresentou resultados mais eficientes e, por tanto, foi o selecionado para as reações em biocatálise. O sólido fermentado otimizado por *P. roqueforti* ATCC 10110 (SFPR) e a lipase de *C. rugosa* imobilizada (LCRI) foram caracterizados quanto à sua estabilidade em diferentes solventes e temperaturas. Foi observada elevada estabilidade da LCRI e do SFPR quando incubados em solventes orgânicos por 5 h a 30 °C. A atividade residual contra a trioleína para a LCRI e o SFPR se mantiveram, respectivamente, em cerca de $97,3 \pm 1,8$ e $94,2 \pm 2,2\%$ em n-heptano ($\log P$ 4,0) e $95,6 \pm 0,4$ e $87,8 \pm 1,2\%$ para n-hexano ($\log P$ 3,5). Para acetona ($\log P$ -0,23), EtOH ($\log P$ -0,31) e MeOH ($\log P$ -0,76) o sólido fermentado (SF) apresentou maior estabilidade em relação à LCRI. Ambos os preparados mantiveram suas atividades em pouco mais de 90% quando incubados em n-heptano a 30 °C e mais de 40% para LCRI quando incubada à 40 e 50 °C, ao passo que para o SFPR ficando acima de 60% nessas mesmas condições. A atividade de esterificação (AE) foi avaliada frente ao consumo de ácido oleico do meio reacional. As respectivas AE's para a LCRI e o SFPR foram $8,2 \pm 0,0$ e $3,4 \pm 0,1 \text{ U g}^{-1}\text{SS}$ e conversão em éster de $47,6 \pm 0,2$ e $36,4 \pm 0,1\%$ em 96 h. Ambos os preparados apresentaram alta estabilidade no estudo do reuso em ciclos sucessivos de síntese e mantiveram, parcialmente, os valores de conversão. Esses resultados são promissores e destacam o emprego do SF por *P. roqueforti* ATCC 10110 contendo lipase pela primeira vez em reações de biocatálise.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido, Lipase, *Penicillium roqueforti*, *Candida rugosa*, imobilização, Esterificação.

SOARES, G. A. **Catalyzed esters synthesis using fermented solid by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 compared to the commercial lipase from *Candida rugosa* immobilized on Accurel MP 1000**. 2018, 90 p. Dissertation (Master's Degree in Chemistry) – State University of Santa Cruz, 2018.

ABSTRACT

In the present work, the influence of three SSF culture media for lipase production by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 and the subsequent optimization of the SSF was investigated. The culture media were: A – sugarcane bagasse, soybean oil and nutrient solution; B – sugarcane bagasse with cocoa bean shell, soybean oil and nutrient solution; C – cocoa bean shell, soybean oil and nutrient solution; and D – cocoa bean shell without supplementation. After previous determination, frying palm oil was used as both carbon source and inducer for the optimization study, which was done using response surface methodology and the variables initial substrate moisture (ISM) and frying palm oil concentration (FPO). The highest lipase activity ($52 \pm 5 \text{ U g}^{-1}\text{DS}$, which was 13% higher than that non-optimized condition) was obtained with ISM and FPO of 80 and 23% (w w⁻¹), respectively. The influence of three carriers (Accurel MP 1000, Immobead-150 and Sepabeads FP-BU) on lipase immobilization of *Candida rugosa* was also investigated in order to evaluate the different forms of interaction between the enzyme and the carriers used. The efficiency (E) and retention of activity (R) were evaluated as crucial parameters in the verification of this process. Activity retention was higher when immobilized lipase on Accurel MP 1000 was used, where the R values were greater than 200%. In this sense, the Accurel MP 1000 carrier presented more efficient results and, therefore, it was selected for biocatalysis reactions. The optimized fermented solid by *P. roqueforti* ATCC 10110 (SFPR) and the immobilized *C. rugosa* lipase (LCRI) were characterized for their stability at different solvents and temperatures. High stability of LCRI and SFPR was observed when incubated in organic solvents for 5 h at 30 °C. The residual activity, with triolein as substrate, for LCRI and SFPR remained about, respectively, 97.3 ± 1.8 and $94.2 \pm 2.2\%$ in n-heptane (log P 4.0) and 95.6 ± 0.4 and $87.8 \pm 1.2\%$ for n-hexane (log P 3.5). For acetone (log P -0.23), EtOH (log P -0.31) and MeOH (log P -0.76) the fermented solid (SF) presented greater stability with respect to LCRI. Both enzymatic preparations maintained their activities at slightly over 90% when incubated in n-heptane at 30 °C and more than 40% for LCRI when incubated at 40 and 50 °C, whereas for SFPR being above 60% in these conditions. The esterification activity (AE) was evaluated with consumption oleic acid of the reaction medium. The respective AE's for LCRI and SFPR were 8.2 ± 0.0 and $3.4 \pm 0.1 \text{ Ug}^{-1}\text{DS}$ and ester conversion of 47.6 ± 0.2 and $36.4 \pm 0.1\%$ in 96 h. Both preparations presented high stability in the study of the reuse in successive cycles of synthesis and maintained, in part, the values of conversion. These results are promising and highlight the use of SF by *P. roqueforti* ATCC 10110 containing lipase for the first time in biocatalysis reactions.

Keywords: Solid-state fermentation, Lipase, *Penicillium roqueforti*, *Candida rugosa*, Immobilization, Esterification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Reação de hidrólise e síntese do triacilglicerol catalisada por lipase	17
Figura 1.2 – Reações catalisadas por lipases	19
Figura 1.3 – Mecanismo de reação de lipase	20
Figura 1.4 – Fungo <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110.....	22
Figura 1.5 – Representação da FES do bagaço de cana por <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110	24
Figura 1.6 – Representação esquemática dos métodos empregados em imobilização de enzimas	28
Figura 2.1 – Atividade de hidrólise do sólido fermentado de <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 produzido por fermentação em estado sólido frente a diferentes substratos	47
Figura 2.2 – Cinética de produção de lipase durante o cultivo em estado sólido por <i>P.</i> <i>roqueforti</i> ATCC 10110.....	50
Figura 2.3 – Diagrama de Pareto	52
Figura 2.4 – Gráfico de resíduos	54
Figura 2.5 – Gráficos de superfície de resposta e de contorno	55
Figura 3.1 – Reação de hidrólise do palmitato de <i>p</i> -nitrofenila (<i>p</i> -NPP) catalisada por lipases com liberação de <i>p</i> -nitrofenol e ácido palmítico.....	65
Figura 3.2 – Cinética de imobilização da lipase de <i>Candida rugosa</i> em termos de atividade residual do sobrenadante	68
Figura 4.1 – Reação de esterificação do ácido oleico catalisada por lipases com liberação do oleato de etila e água	78
Figura 4.2 – Estabilidade da lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada em Accurel MP 1000 e do sólido fermentado de <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 em diferentes solventes.....	82
Figura 4.3 – Termoestabilidade da lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada em Accurel MP 1000 e do sólido fermentado de <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110.	84

Figura 4.4 – Esterificação catalisada pela lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada em Accurel MP 1000 e pelo sólido fermentado de <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110	85
Figura 4.5 – Reuso da lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada em Accurel MP 1000 e do sólido fermentado de <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Classificação das enzimas	16
Tabela 1.2 – Estudos de aplicação do sólido fermentado na produção do biodiesel	30
Tabela 2.1 – Variáveis e níveis do planejamento DCCR para a otimização da produção de lipase em fermentação no estado sólido.....	45
Tabela 2.2 – Variáveis, níveis e resultados experimentais do delineamento composto central rotacional aplicado à otimização das condições de cultivo sólido por <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 para produção de lipase	51
Tabela 2.3 – ANOVA para o modelo reduzido ajustado	53
Tabela 3.1 – Propriedades dos suportes utilizados na imobilização da lipase de <i>Candida rugosa</i>	63
Tabela 3.2 – Principais parâmetros avaliados na imobilização de lipase de <i>Candida rugosa</i> nos diferentes suportes	69

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	13
1.1 INTRODUÇÃO	13
1.2 OBJETIVOS	15
1.2.1 Geral.....	15
1.2.2 Específicos	15
1.3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
1.3.1 Breve histórico das enzimas.....	16
1.3.2 Lipases – Aspectos Gerais	17
1.3.2.1 Definição.....	17
1.3.2.2 Aspectos estruturais e mecanismos de reação	18
1.3.2.3 Fontes de obtenção e propriedades das lipases	21
1.3.2.4 <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110.....	22
1.3.2.5 Fermentação em estado sólido (FES): definição	23
1.3.2.5.1 Fatores que influenciam a FES.....	26
1.3.3 Demanda industrial: a enzima lipase	26
1.3.4 Imobilização de lipases.....	27
1.3.5 Aplicação de sólido fermentado contendo atividade lipolítica na síntese do biodiesel	29
1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO II	
Otimização da produção de lipase por <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 em fermentação no estado sólido do bagaço de cana utilizando óleo de dendê de fritura	38
2.1 INTRODUÇÃO	40
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	41
2.2.1 Obtenção e cultivo do micro-organismo	41
2.2.2 Preparo do inóculo	42
2.2.3 Ensaio preliminares	42
2.2.4 Substratos	42
2.2.4.1 Seleção dos substratos	42

2.2.4.2	Fermentação em estado sólido (FES) com farelo de cacau	43
2.2.4.3	Diferentes meios adotados em FES	43
2.2.5	Preparo da solução nutriente.....	44
2.2.6	Cinética da produção de atividade do sólido fermentado	44
2.2.7	Otimização das condições de cultivo utilizando delineamento composto central rotacional	44
2.2.8	Métodos analíticos.....	45
2.2.8.1	Determinação da umidade.....	45
2.2.8.2	Secagem do sólido fermentado	45
2.2.8.3	Dosagem de atividade de hidrólise.....	46
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
2.3.1	Ensaio preliminares	46
2.3.1.1	Seleção dos substratos	46
2.3.2	Cinética da produção de atividade do sólido fermentado	49
2.3.3	Otimização das condições de cultivo utilizando delineamento composto central rotacional	51
2.4	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS	58
CAPÍTULO III		
Imobilização de lipase comercial de <i>Candida rugosa</i> em Accurel MP 1000		
		61
3.1	INTRODUÇÃO	62
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	63
3.2.1	Estudos de imobilização de lipase de <i>Candida rugosa</i>	63
3.2.1.1	Seleção do suporte e cinética de imobilização	63
3.2.1.2	Imobilização em Accurel MP 1000 e em Sepabeads FP-BU	64
3.2.1.3	Imobilização em imobead-150.....	65
3.2.2	Métodos analíticos.....	65
3.2.2.1	Cinética enzimática de hidrólise pelo método <i>p</i> -NP (<i>p</i> -nitrofenil) em leitor de microplacas	65
3.2.2.2	Atividade de hidrólise em meio orgânico	66
3.2.2.2.1	Método de Lowry-Tinsley.....	66
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.3.1	Cinética de imobilização e seleção do suporte	67

3.4	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72
CAPÍTULO IV		
Caracterização e aplicação na síntese de ésteres do sólido fermentado por <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 comparada à uma lipase comercial de <i>Candida rugosa</i> imobilizada em Accurel MP 1000		
	74
4.1	INTRODUÇÃO.....	76
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	77
4.2.1	Caracterização em meio orgânico.....	77
4.2.1.1	Estabilidade em solventes orgânicos.....	77
4.2.1.2	Estabilidade à temperatura.....	77
4.2.1.3	Atividade de esterificação.....	78
4.2.1.4	Reuso da LCRI e do SFPR na síntese de ésteres em <i>n</i> -heptano.....	79
4.2.2	Métodos analíticos.....	79
4.2.2.1	Atividade de hidrólise em meio orgânico.....	79
4.2.2.2	Método de Lowry-Tinsley.....	80
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
4.3.1	Caracterização em meio orgânico.....	80
4.3.1.1	Estabilidade em solventes orgânicos.....	80
4.3.1.2	Estabilidade à temperatura.....	83
4.3.1.3	Atividade de esterificação e conversão em éster.....	85
4.3.1.4	Reutilização da LCRI e do SFPR na síntese de ésteres em <i>n</i> -heptano.....	86
4.4	CONCLUSÃO.....	88
4.5	PERSPECTIVAS.....	89
4.6	AGRADECIMENTOS.....	89
	REFERÊNCIAS.....	90

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

Lipases obtidas por técnicas com custo menos acentuado, utilizando-se de resíduos da fruticultura, como a fermentação em estado sólido (FES), tem se tornado uma alternativa promissora na produção destas enzimas. Nesse sentido, a FES se destaca, pois a partir do crescimento microbiano sobre o substrato sólido empregado, uma série de compostos são produzidos, dos quais, as enzimas têm elevada importância (GERVAIS; MOLIN, 2003).

Uma importante tarefa no desenvolvimento de um bioprocessos para obtenção de lipases é a escolha do micro-organismo. Algumas espécies do gênero *Penicillium* têm sido indicadas como fontes de enzimas lipolíticas (LIMA et al., 2003; ROMERO et al., 2014). Contudo, outras espécies, como, por exemplo, *Penicillium roqueforti*, tem sido muito pouco explorada para produção de lipases por FES. *Penicillium roqueforti* apresenta algumas características favoráveis à fermentação, que incluem o desenvolvimento em diferentes condições de pH e atividade de água (a_w) (MIOSO; MARANTE; LAGUNA, 2015).

As enzimas produzidas nestes bioprocessos, muitas vezes, necessitam de pré-purificação e imobilização para, efetivamente, serem aplicadas a reações mais nobres. Uma vez imobilizadas, essas enzimas adquirem mais estabilidade (operação em faixas mais amplas de pH e temperatura), podem ser reutilizadas em ciclos sucessivos de síntese e devido a heterogeneidade da reação podem ser retiradas do meio com facilidade (PANESAR et al., 2006). Por outro lado, o custo para esses tipos de processo pode ser elevado, já que, na maioria das vezes, suportes comerciais e reagentes são utilizados para promover de maneira eficiente a imobilização da enzima.

Nessa perspectiva, a não extração das enzimas do meio de cultivo, objetivando o emprego direto do sólido fermentado (SF) nas reações, tem sido amplamente investigado (DIAS et al., 2017; FERNANDES et al., 2007; SALUM et al., 2010; SOARES et al., 2013, 2015). Esse tipo de metodologia permite a reutilização do sólido em reações sucessivas, o que acarreta em menor custo, pois não há necessidade de purificação ou imobilização, uma vez que as lipases produzidas já estariam naturalmente imobilizadas (ZAGO et al. 2014).

Neste sentido, esse trabalho de pesquisa visou o emprego da FES por *P. roqueforti* ATCC 10110 em resíduos agroindustriais e insumos de baixo custo na produção de lipase, visando sua aplicação na síntese de ésteres etílicos, bem como sua comparação frente ao desempenho catalítico de uma lipase comercial de *Candida rugosa* imobilizada em Accurel MP 1000. A comparação em relação à lipase de *C. rugosa* é devido ao desempenho satisfatório desta enzima amplamente demonstrado na literatura (ABDULLAH; SULAIMAN; KAMARUDDIN, 2009; PIRES-CABRAL, FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2010)

Este é o primeiro relato demonstrando o uso de sólido fermentado contendo atividade de lipases de *P. roqueforti* ATCC 10110 empregado diretamente em reações, o que neste sentido, minimizam etapas que sucedem o cultivo sólido.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Geral

Otimizar a produção de lipases de *P. roqueforti* ATCC 10110 em FES, visando a aplicação do sólido fermentado na síntese de ésteres comparada à lipase comercial de *Candida rugosa* imobilizada em Accurel MP 1000.

1.2.2 Específicos

- Avaliar o potencial do fungo *P. roqueforti* ATCC 10110 na produção de lipase em fermentação no estado sólido em diferentes meios suplementados, empregando uma solução nutriente e compará-los à produção em meios não suplementados;
- Realizar cinética da produção de lipase do sólido fermentado a fim de se obter o melhor tempo de cultivo nas condições empregadas;
- Investigar os parâmetros umidade inicial (UD) e fonte de carbono e indutor (FC&I) na otimização da produção de lipase;
- Imobilizar a lipase de *C. rugosa* em diferentes suportes, avaliando, como parâmetros, a eficiência do processo e a retenção de atividade;
- Selecionar o melhor suporte frente à atividade de hidrólise em meio orgânico;
- Avaliar a estabilidade da lipase de *C. rugosa* imobilizada em Accurel MP 1000 (LCRI) e do sólido fermentado por *P. roqueforti* ATCC 100110 (SFPR) em diferentes solventes e verificar a termoestabilidade desses preparados em *n*-heptano;
- Aplicar a LCRI e o SFPR em reações de esterificação e avaliar o reuso desses preparados na síntese de ésteres.

1.3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.3.1 Breve histórico das enzimas

A história da bioquímica relaciona-se profundamente a pesquisas com enzimas. James Sumner isolou e cristalizou a primeira enzima (urease) em 1926, sendo esta responsável pela catálise da hidrólise da ureia em NH_3 e CO_2 . Com exceção de alguns RNAs (ribozimas) que são catalisadores durante seu próprio processamento, todas as enzimas são proteínas, as quais aumentam a velocidade de uma reação por um fator de 10^{14} vezes mais do que uma reação não catalisada (VOET; VOET; PRATT, 2000).

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para reações biocatalíticas. Cada reação está atrelada à uma subclasse de enzima e devido ao grande número de enzimas existentes, elas são classificadas pela União internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) sendo distinguidas pelas reações que mediam (TABELA 1.1). A nomenclatura utiliza a abreviação E.C. (*Enzyme Commission*) seguida de até quatro dígitos referentes à classe e subclasses que a enzima pertence, e um nome sistemático que identifica a reação catalisada. Como este trabalho está relacionado às lipases, será dado mais enfoque na descrição desta classe de enzimas. As lipases são catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica (FABER, 1997).

Tabela 1.1 – Classificação das enzimas

Classe de enzimas	Algumas subclasses	Reações catalisadas
Oxidorrredutases E.C. 1	Hidrogenases, oxidases, Peroxidases	Oxidação e redução: oxidação das ligações C-H, C-C, C=C, C=O
Transferases E.C. 2	Transaldolases, transcetolase	Transferência de grupos: aldeídico, cetônico, acila, açúcar, fosforila ou metila
Hidrolases E.C. 3	Esterases, lipases, peptidases, celulases, amilases	Hidrólise e síntese de ésteres, amidas, epóxidos, nitrilas e anidridos e hidrólise de carboidratos
Liasas E.C. 4	Descarboxilases, cetoacidolases	Adição eliminação de pequenas moléculas a ligações C=C, C=N, C=O
Isomerases E.C. 5	Racemases, epimerases, mutases	Isomerizações tais como racemização e epimerização
Ligases E.C. 6	DNA-ligases, NAD ⁺ -sintetases	Síntese e clivagem de ligações C-O, CS, C-N, C-C

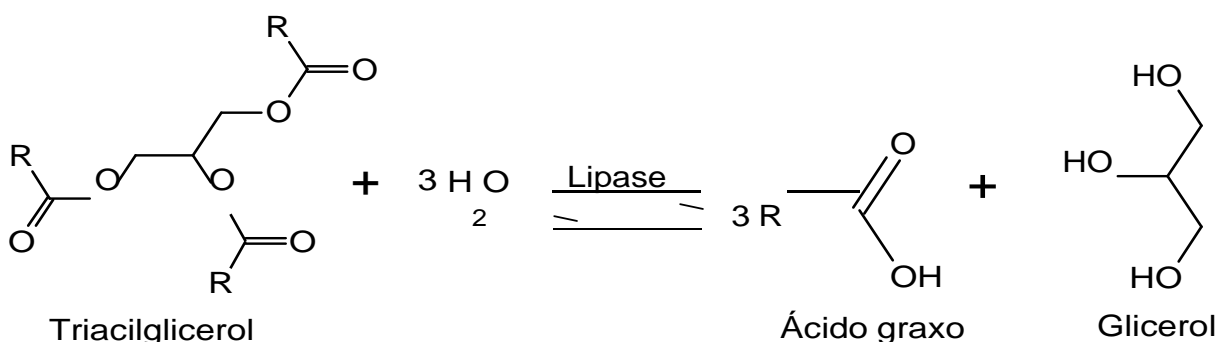
Fonte: adaptado de Costa (2014).

1.3.2 Lipases – Aspectos Gerais

1.3.2.1 Definição

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol (FIGURA 1.1), constituindo uma classe especial de esterases (EC. 3.1.1.1). No entanto, lipases são carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila constituída por mais de 10 átomos de carbono. Enquanto, as esterases apresentam capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos (GHALY et al., 2010; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). Vale ressaltar, que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro.

Figura 1.1 – Reação de hidrólise e síntese do triacilglicerol catalisada por lipase



Fonte: adaptado de Jaeger et al., 1994.

Em 1958, Sarda e Desnuelle definiram as lipases a partir de sua característica cinética, que é a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água. Segundo estes autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados, enquanto as esterases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água. Esse tipo de ativação promove aumento da atividade que é justificado por um rearranjo estrutural da região do sítio ativo. Na ausência da interface lipídeo/água, o sítio ativo de diversas lipases encontra-se coberto por uma tampa (*lid*). No entanto, na presença de substâncias hidrofóbicas, a *lid* se abre, expondo o sítio ativo. A *lid* pode ser formada por uma única hélice, por duas

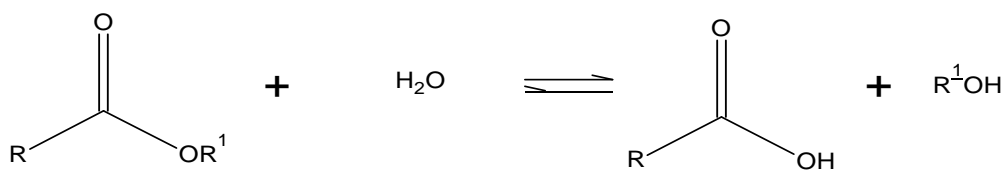
hélices ou por um *loop*. Entretanto, existem lipases que são desprovidas de *lid* e não apresentam ativação interfacial (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

1.3.2.2 Aspectos estruturais e mecanismos de reação

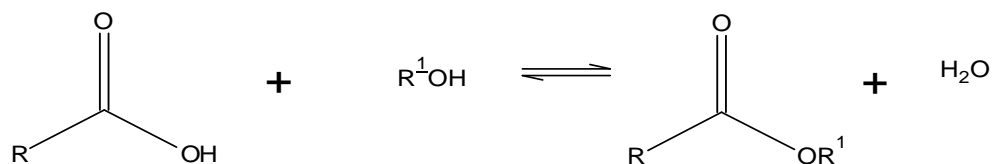
Este grupo de enzimas destaca-se como uma eficiente ferramenta não somente para catalisar reações de hidrólise, mas também esterificação (em meios com baixa disponibilidade de água) de transesterificação (alcoólise, acidólise e interesterificação), aminólises (síntese de aminas) e lactonização (FIGURA 1.2) envolvendo ésteres insolúveis em água, utilizados na produção de combustíveis, cosméticos, drogas e herbicidas (BROCKMAN; MOMSEN; TSUJITA, 1988). Geralmente, não requerem cofatores, ou seja, pequenas moléculas orgânicas ou inorgânicas necessárias para a sua função catalítica. Além disso, as lipases podem atuar numa ampla faixa de pH e são relativamente estáveis a altas temperaturas (PANDEY et al., 1999).

Todas as lipases conhecidas, tanto de eucarióticos quanto de procarióticos, possuem a estrutura tridimensional do tipo α/β hidrolases (SCHRAG e CYGLER, 1997). Essa estrutura apresenta um núcleo central composto por fitas β -paralelas, rodeado por porções em α -hélices. O sítio ativo das lipases é composto por uma tríade catalítica formada pelos aminoácidos serina, aspartato (ou glutamato) e histidina (ALOULOU et al., 2006; JAEGER; REETZ, 1998).

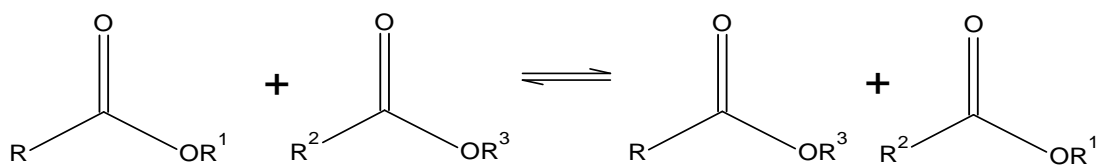
Figura 1.2 – Reações catalisadas por lipases



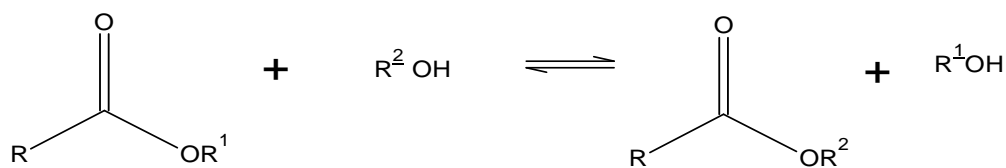
Hidrólise



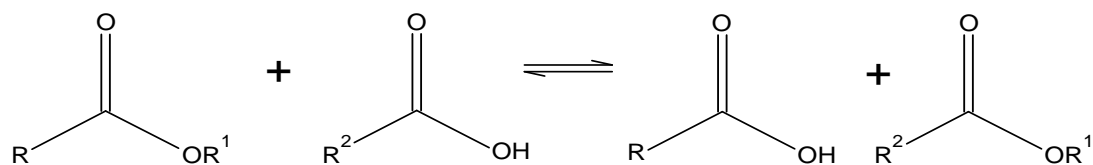
Esterificação



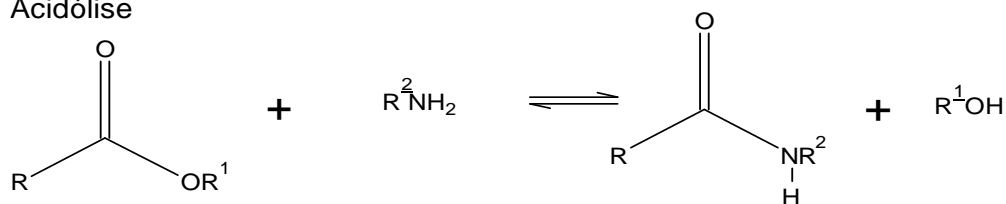
Interesterificação



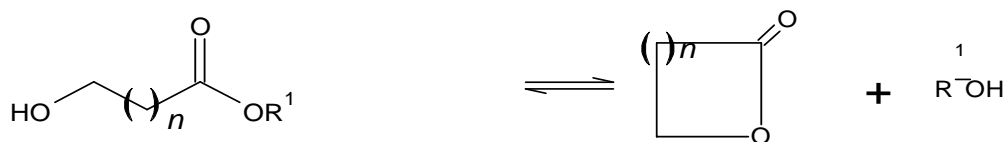
Alcólise



Acidólise



Aminólise



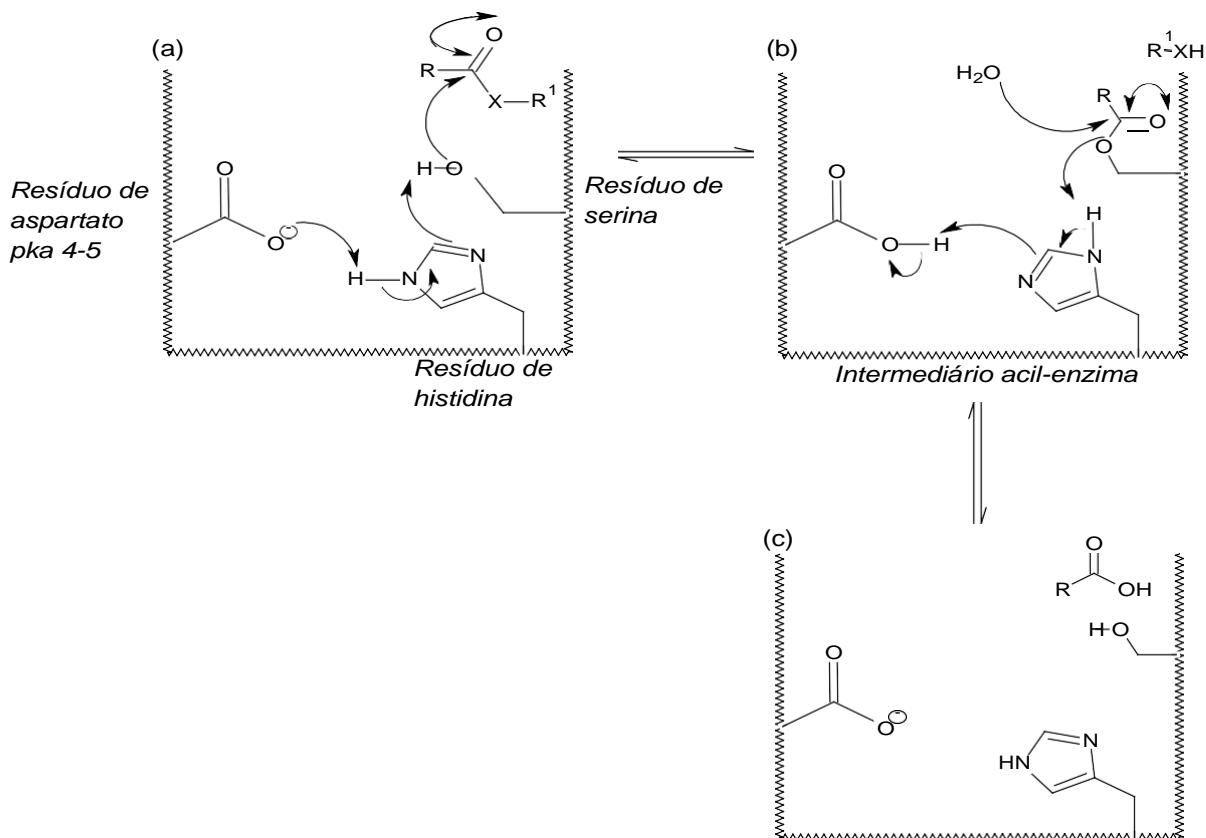
Lactanização

Fonte: adaptado de Paques e Macedo (2006).

O mecanismo geral da hidrólise (FIGURA 1.3) do substrato por lipases é realizada através da formação de um intermediário tetraédrico, que é estabilizado por

interações com os aminoácidos que constituem uma cavidade no sítio ativo, chamada cavidade do oxianion (FICKERS; MARTY; NICAUD, 2011; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

Figura 1.3 – Mecanismo de reação de lipase



Fonte: adaptado de Reis et al. (2009).

Na primeira etapa, a serina é ativada por desprotonação, promovida por histidina e aspartato (a); conseqüentemente, a nucleofilicidade do resíduo de serina é aumentada e ataca o carbono carbonílico do substrato formando um intermediário acil-enzima (b); a presença do oxianion na cavidade contribui para a estabilização da distribuição de carga e redução de energia do estado fundamental do intermediário tetraédrico; a etapa de desacilação (c) é controlada pela eletronegatividade das moléculas vizinhas. Neste processo, um nucleófilo (por exemplo, H₂O ou monoglicérido) ataca a enzima acilada conduzindo à liberação e regeneração do produto do sítio catalítico.

Um intermediário tetraédrico transitório é formado, que se caracteriza pela carga negativa do oxigênio carbonílico da ligação éster a ser clivada e pelos quatro átomos ligados ao C carbonílico dispostos de forma tetraédrica. O intermediário é estabilizado pelas ligações hidrogênio entre o átomo de oxigênio carbonílico negativamente carregado (oxianion) e entre pelo menos dois grupos -NH peptídicos da cavidade do oxianion. A nucleofilicidade da serina (Ser) que ataca é aumentada pela histidina (His) do sítio catalítico, para a qual é transferido um próton do grupo -OH da Ser. A transferência desse próton é facilitada pela presença do ácido catalítico,

o qual orienta precisamente o anel imidazol da His e, parcialmente, neutraliza a sua carga. Subsequentemente, o próton é doado ao oxigênio da ligação éster, que é então clivada. Neste estágio, o componente ácido do substrato é esterificado à Ser nucleofílica (intermediário covalente), enquanto que o componente álcool se difunde no meio. Em seguida, ocorre a etapa de desacilação, na qual uma molécula de água hidrolisa o intermediário covalente. A His do sítio ativo ativa essa molécula de água pela ligação a um de seus prótons. O íon OH^- resultante ataca o C carbonílico do grupo acil covalentemente ligado à Ser. Novamente se forma um intermediário tetraédrico transitório negativamente carregado, o qual é estabilizado por interações com a cavidade oxianion. A His doa um próton ao oxigênio da Ser ativa, liberando o componente acil como ácido carboxílico, e a enzima que pode iniciar a catálise de outra molécula de substrato (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

1.3.2.3 Fontes de obtenção e propriedades das lipases

As lipases podem ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de micro-organismos, tais com os fungos *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., por leveduras *Tulopsis* sp. e *Candida* sp. e bactérias como *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp., *Staphylococcus* sp. etc. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases oriundas de micro-organismos são preferíveis, devido à facilidade no controle das condições de cultivo e baixos custos de operação (CASTRO; ANDERSON, 1995).

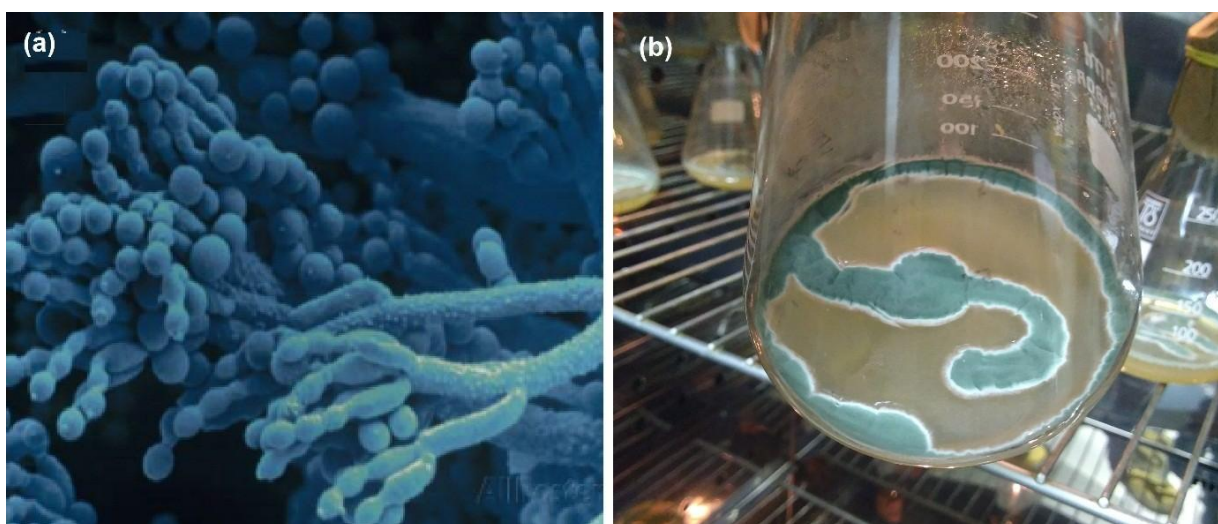
Devido à sua grande versatilidade, as lipases têm sido empregadas em inúmeras atividades industriais, desde aditivos em detergentes até síntese de compostos orgânicos. Essa versatilidade se deve ao fato de atuarem em uma ampla faixa de pH (3 – 11) e à estabilidade em altas temperaturas (40 – 70°C) e solventes orgânicos (*n*-heptano, *n*-hexano etc.) (LIMA et al., 2004; SALUM et al., 2008). Podem ser utilizadas em diversos tipos de substratos e possuem propriedades regio e enantiosseletivas (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Embora muitos processos industriais ocorram em altas temperaturas, tem-se estudado o uso de lipases em condições que requerem baixas temperaturas e economizam energia (YADAV et al., 2011). Um dos campos importantes de aplicação das lipases tem sido a síntese de

biodiesel, principalmente quando os substratos são óleos ou gorduras residuais (PARK; SATO; KOJIMA, 2006).

1.3.2.4 *Penicillium roqueforti* ATCC 10110

O *Penicillium roqueforti* é um fungo filamentososo que pode ser isolado do solo. O *Penicillium* multiplica-se vegetativamente por conídios produzidos em cadeia em conidióforos que se ramificam na extremidade, lembrando uma vassoura (FIGURA 1.4a). Estes conídios, após disseminados, produzirão novo micélio (KIMATI et al., 1978). Esse micélio responsável pela nutrição do fungo é formado por hifas e possui coloração azul esverdeada, conforme apresentado na Figura 1.4b.

Figura 1.4 – Fungo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110



Fonte: CorbisImages (©2015) (a); arquivo pessoal (b).
Parte “a” (morfologia microscópica) e parte “b” (morfologia macroscópica).

Do ponto de vista industrial, *P. roqueforti* é utilizado, principalmente, para obtenção de lipases, estando disponível comercialmente a lipase R “Amano”[®] obtida desse micro-organismo (produzida pela Amano Enzyme, Inc., Japan) (Li e Zong, 2010). Embora seja apenas descrito como um fungo terrestre, diferentes estudos mostraram que *P. roqueforti* é capaz de crescer em soluções salinas e que a germinação de conídios é inibida apenas em concentrações de NaCl maiores que 100 g L⁻¹. *Penicillium roqueforti* produz vários tipos de proteínas lipolíticas ativas que diferem em peso molecular, composição de aminoácidos/carboidratos, especificidade do substrato e preferência por condições de incubação como temperatura e pH (MIOSO; MARANTE; LAGUNA, 2015). Mase, Matsumiya e Matsuura, (1995)

caracterizaram a lipase de *P. roqueforti* IAM 7268, produzida por fermentação submersa durante 72 h a 25 °C, quanto ao seu peso molecular (25 kDa), ponto isoelétrico (7,2), pH e temperatura ótimas de 6,0-7,0 e 35 °C, respectivamente, apresentando estabilidade em pH 6,0-8,0 por 15 min a 30 °C.

Já a produção de enzimas industriais por *P. roqueforti* em fermentação no estado sólido ainda é pouco estudada. Nesta perspectiva, este fungo tem sido avaliado na produção de enzimas pectinolíticas, empregado em FES do óleo de abóbora combinado com farelo de trigo por 120 h e 25 °C, sendo relado atividade máxima de 1420,0 U g⁻¹ SS (PERIČIN et al., 2007); lipolíticas, pela FES do farelo de milho e uma solução de nutrientes composta por 13,4 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 16,8 g L⁻¹ de K₂HPO₄ e 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O durante 144 h e 29 °C, sendo observada atividade máxima de lipase para *P. roqueforti* de 8,0 U mL⁻¹ (RIVERA-MUÑOZ et al., 1991) e pela FES do farelo de cacau durante 60 h a 27 °C, com atividade máxima de lipase de 17,33 ± 2,3 U g⁻¹ (SILVA et al., 2017); e xilanolíticas, empregando resíduo de cajá em FES após 142 h e 25 °C com atividade máxima de 14,03 U g⁻¹ (FERRAZ et al., 2018) e pelo emprego do bagaço de cana suplementado com diferentes fontes de carbono e nitrogênio em FES durante 93 h a 23 °C, sendo relatada máxima atividade de xilanase de 19,95 U g⁻¹ (SOUZA et al., 2018).

As lipases de origem fúngica são preferíveis às de origem animal, porque as primeiras são termicamente mais estáveis e não se desnaturam a altas temperaturas ou com alterações no pH (DHEEMAN; FRIAS; HENEHAN, 2010). Algumas lipases são regiosseletivas, reagindo com triglicerídeos na posição sn-1 ou sn-3. As lipases obtidas de *P. roqueforti* exibem especificidade, mesmo em relação aos ácidos graxos de cadeia curta, ou seja, elas são acil-específicas para ácidos graxos de menor cadeia (MIOSO; MARANTE; LAGUNA, 2015).

1.3.2.5 Fermentação em estado sólido (FES): definição

Há dois tipos básicos de fermentação para produção de enzimas e outros metabólitos: a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS). Um dos parâmetros mais contundentes na diferenciação desses bioprocessos é a disposição de água livre presente no meio de cultivo (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2002; PANDEY, 2003; RAGHAVARAO; RANGANATHAN; KARANTH, 2003). Em se tratando da FES, a água presente nesses sistemas encontra-se

complexada com a matriz sólida do substrato ou como uma fina camada absorvida pela superfície das partículas. Em geral, nesses processos o teor de umidade varia entre 18-85% e a atividade de água típica vai de 0,40-0,90, mimetizando condições encontradas na natureza e permitindo até que sejam conduzidos sem prévia esterilização, visto que a contaminação é menos pronunciada (RAIMBAULT, 1998; ROBINSON; NIGAM, 2003).

Bramorski et al. (1998) e Durand et al. (1993), definem a FES (FIGURA 1.5), mais detalhadamente, como uma técnica onde o crescimento dos micro-organismos se dá no interior de partículas porosas úmidas (suporte ou matriz sólida), na qual o conteúdo do líquido contido na matriz sólida deve ser mantido em valores de atividade de água que assegure o crescimento e metabolismo celular, mas que não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz. A matriz sólida pode ser classificada em duas categorias: 1) as partículas são, ao mesmo tempo, suporte e substrato (materiais orgânicos e lignocelulósicos); 2) a matriz sólida é apenas um suporte e deve ser acrescida de nutrientes.

Figura 1.5 – Representação da FES do bagaço de cana por *P. roqueforti* ATCC 10110



Fonte: arquivo pessoal.

Mitchell, Krieger e Berovic (2006) e Pandey (2003) definem que o meio de cultura é composto de substratos sólidos, com um dado teor de umidade e, nesse sentido, a água torna-se um fator limitante do processo, o que não ocorre na fermentação submersa, onde há abundância do líquido. Abaixo do limite mínimo, os

micro-organismos não se desenvolvem. O limite superior é fixado em função da capacidade de absorção de água pelo material empregado.

Nesse sentido, os autores ainda afirmam que é difícil estabelecer, de maneira contundente, vantagens entre a fermentação submersa e a sólida, pois cada micro-organismo pode se adequar de forma mais favorável a este ou aquele processo e também produzir complexos enzimáticos diferentes. Algumas características da FES podem ser observadas em relação à FS:

- Menores riscos de contaminação, devido à baixa umidade do meio;
- Simplicidade no preparo do meio de fermentação, pois se necessita, geralmente, de uma matriz sólida (por exemplo, resíduo agroindustrial) e de água para umedecer;
- Possibilidade de emprego de resíduos abundantes e de custo reduzido como matéria-prima, especialmente em países como o Brasil;
- O crescimento celular ocorre em condições mais próximas às dos habitats naturais;
- O meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão totalmente acessíveis ao micro-organismo;
- Maiores rendimentos e concentrações mais altas do produto desejado;
- Baixo consumo de água.

O processo em estado sólido apresenta algumas limitações, que devem ser consideradas. Neste contexto, destaca-se que, em operações de grande escala, o calor gerado pelo metabolismo microbiano deve ser removido, o que se torna mais difícil na FES, contrariamente a FS, pois a grande quantidade de água presente no meio facilita o controle da temperatura (MURTHY; KARANTH; RAO, 1993; RAMESH; LONSANE, 1991). Além disto, a heterogeneidade da mistura na FES dificulta o controle do crescimento microbiano e de parâmetros como temperatura, pH, agitação, aeração e concentração de nutrientes e produtos, o que torna muito complicado controlar e automatizar o processo (GERVAIS; MOLIN, 2003; PANDEY, 2003).

Contudo, de acordo com Madamwar e Patel (1992), estudos demonstram que enzimas obtidas por FES apresentam maior atividade enzimática por unidade de volume, o que favorece de forma significativa os processos de purificação, que representam custo elevado na produção enzimática. Além disso, a produção de enzimas obtidas por FES apresentam níveis de atividade superiores aos obtidos pelo

cultivo submerso, além de se obter enzimas com propriedades funcionais mais favoráveis às aplicações industriais (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2000).

1.3.2.5.1 Fatores que influenciam a FES

A síntese de lipases em um bioprocesso como a FES pode ser influenciada por diversos fatores. Um dos parâmetros mais contundentes, principalmente quando se trata da produção de enzimas utilizando fungos filamentosos, é a temperatura. Os

cultivos onde são empregadas matrizes sólidas como substratos são geralmente exotérmicos, que por consequência produzem grande quantidade de calor relacionado ao metabolismo do micro-organismo. A baixa condutividade térmica, característica de muitos substratos, acaba tornando a temperatura como um fator crítico, porque podem

ocorrer gradientes de temperaturas no meio produtivo, podendo gerar até a desnaturação dos produtos formados. Assim, o controle da temperatura deve estar relacionado à capacidade do sistema em promover aeração do meio (PANDEY, 2003).

O teor de umidade se destaca, também, como parâmetro de elevada importância em cultivos sólidos. A difusão dos solutos, gases e metabólitos é facilitada pela quantidade de água presente na fase sólida, o que afeta diretamente a atividade microbiana. Nesse sentido, a atividade da água (a_w) do substrato é um parâmetro fundamental para transferência de massa de água e solutos através das células microbianas (PANDEY, 2003).

O uso de indutores como fonte de energia e carbono tem se mostrado como parâmetro fundamental, para a maioria dos micro-organismos, na maximização da produção de lipase. Tem-se utilizado como indutores triglicerídeos, ésteres ou ácidos graxos adicionados em baixas concentrações como única fonte de carbono. Os ácidos graxos presentes nos óleos usados como indutores são principalmente o oleico e o linoleico (CASTILHO et al., 2000).

1.3.3 Demanda industrial: a enzima lipase

A maior fatia do mercado industrial de enzimas é ocupada pelas hidrolíticas e, dentro destas, as lipases possuem grande destaque, sendo aplicadas na síntese de produtos de interesse nas áreas clínica nutricional, ambiental, industrial e biotecnológica (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Apesar das lipases serem

particularmente usadas na síntese de ésteres e amidas, sendo também empregadas nos processos produtivos de álcoois primários e secundários, bem como, ácidos carboxílicos (MOREAU et al., 2008), elas também são aplicadas nas reações de esterificação, transesterificação, acidólise e aminólise.

Essas características abrem margem para a utilização de lipases na produção industrial a partir de óleos vegetais, que já é produzido em escala industrial através de catalisadores químicos ácidos ou básicos (MOREAU et al., 2008). Porém, as lipases são enzimas com alto custo, sendo este um aspecto crítico na implantação de processos enzimáticos na síntese orgânica. Ainda, no sentido de diminuir o custo de produção da lipase, a utilização de técnicas simples de produção, purificação e/ou imobilização pretendendo garantir o processo de estabilização enzimática, torna-se um fator de extrema importância.

1.3.4 Imobilização de lipases

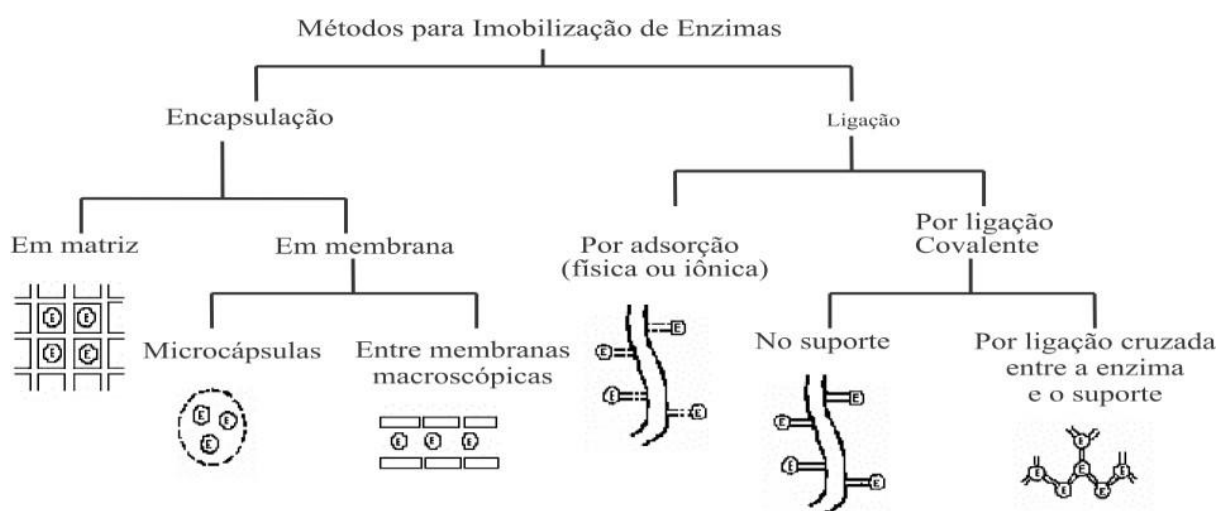
As lipases não possuem estabilidade suficiente na forma solúvel em condições operacionais, podendo assim, perder sua atividade catalítica devido à desnaturação provocada por solventes, por solutos ou pela agitação mecânica, além disso, a solubilização da enzima no meio reacional dificulta a sua separação e, assim, sua reutilização. Esses fatos são um grande inconveniente que impede o uso massivo de lipases e enzimas em geral em nível industrial (CAO, 2005; JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade térmica em solventes orgânicos (MATEO et al., 2007). As principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas são: a enzima passa a ser um catalisador heterogêneo, permitindo a sua reutilização e facilitando a separação e extração de substratos e produtos do meio reacional; desenvolvimento de sistemas contínuos; facilidade de cone e automação; maior estabilidade; uso mais eficiente do catalisador; flexibilidade no desenho de reatores; geração de efluentes livres de catalisador. Estas vantagens tornam as reações catalisadas por enzimas imobilizadas potencialmente competitivas econômica e ambientalmente, frente o uso de catalisadores químicos. Porém, no que concerne a efetividade do processo, não

deverão ocorrer alterações estruturais na enzima, como modificações no sítio ativo (TISCHER; WEDEKIND, 1999).

Inúmeros métodos têm sido descritos na literatura para efetivação desses processos. A imobilização pode ocorrer por adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (FIGURA 1.6) (HAIDER; HUSAIN, 2009). Na seleção de um suporte para uma determinada aplicação, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como as relativas à possibilidade de regeneração do material.

Figura 1.6 – Representação esquemática dos métodos empregados em imobilização de enzimas



Fonte: (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO, 2004).

O processo de imobilização e o uso repetido e contínuo do derivado, algumas vezes, requerem o uso de operações como filtração, centrifugação e agitação, portanto, o suporte deve ter boa resistência mecânica. Outra característica importante é a estabilidade térmica do suporte, pois dependendo do seu coeficiente de expansão, podem sofrer distorção ou destruir o sítio ativo da enzima sob expansão ou contração, quando submetido a variações de temperatura (PANESAR et al., 2006). O suporte deve ser quimicamente resistente às condições das etapas que antecedem a imobilização, durante o processo de imobilização e nas condições em que se processa a reação; devem possuir grupos químicos que podem ser ativados ou modificados de modo a permitir a ligação da enzima sem desnaturá-la.

A morfologia do suporte é muito importante, pois o mesmo deve ter alta porosidade, o que permite ter uma grande área superficial interna para a imobilização da enzima, e poros com diâmetro suficiente para permitir o fácil acesso da enzima e do substrato. Os suportes orgânicos são mais apropriados para uso industrial por apresentarem elevada resistência mecânica, boa estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ao ataque por micro-organismos. Eles são de fácil regeneração por pirólise e apresentam boa rigidez da matriz, sendo estáveis em uma ampla faixa de pressões, temperaturas e pH. Entretanto, a maioria das enzimas imobilizadas comercializadas é obtida com matrizes orgânicas devido, provavelmente, à variedade de grupos funcionais reativos que podem ser introduzidos nesses suportes (RODRIGUES et al., 2008).

1.3.5 Aplicação de sólido fermentado contendo atividade lipolítica na síntese do biodiesel

As muitas aplicações de lipases incluem sínteses orgânicas, hidrólise de gorduras e óleos, intensificação de sabor em alimentos processados, resolução de misturas racêmicas e análises químicas. As reações de esterificação e transesterificação catalisadas por lipases têm especial importância, pois ésteres compõem uma gama de produtos comercialmente importantes, como biocombustíveis e aromas (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

A catálise por lipases em reações de esterificação e transesterificação estão entre as alternativas mais promissoras em relação aos métodos químicos tradicionais como o emprego de um álcool e um ácido orgânico ou um triacilglicerol, na presença de ácidos tais como ácido sulfúrico, ácido *p*-tolueno sulfônico e ácido fosfórico, os quais são utilizados como catalisadores homogêneos. O uso de lipases possui vantagens como especificidade a diferentes substratos, regio e enantiosseletividade, não necessitam de cofatores, atuam sob condições amenas, e necessitam de pouca energia (KRISHNA et al., 2001).

Dentro dessa perspectiva, o uso do sólido fermentado empregado diretamente no meio reacional tem sido altamente explorado na síntese do biodiesel (TABELA 1.2), pois além de serem utilizados como uma alternativa ao uso de enzimas purificadas/imobilizadas, proporcionam heterogeneidade ao meio reacional, facilitando a separação dos produtos formados (DIAS et al., 2017; ZAGO et al., 2014).

Tabela 1.2 – Estudos de aplicação do sólido fermentado na produção do biodiesel

Fonte de lipases	Preparado enzimático	Reação	Álcool e Matéria graxa	Razão molar	Solvente	Conversão, Tempo e Temperatura	Referência
<i>Rhizopus microsporus</i>	BC e solução nutriente	Esterificação	Etanol/ácido oleico	10:1	livre	98%/48 h/40 °C	(Botton et al., 2018)
<i>Burkholderia lata</i> LTEB11	BC e FSG	Esterificação	Etanol/oleína	1,5:1	livre	88%/24 h/45 °C	(Dias et al., 2017)
<i>Rhizopus microsporus</i>	BC e FSG	Transesterificação	Etanol/óleo de milho	3:1	<i>n</i> -heptano	91%/ 48 h/ 44 °C	(Zago et al., 2014)
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	BC e FSG	Transesterificação	t-butanol/óleo de soja	4:1	<i>n</i> -heptano	86%/ 96 h/ 45 °C	(Liu et al., 2013)
<i>Burkholderia lata</i> LTEB11	BC e FSG	Esterificação	Etanol/ácido oleico	3:1	<i>n</i> -hexano	92%/8 h/40 °C	(Soares et al., 2013)
<i>Burkholderia lata</i> LTEB11	BC e FSG	Transesterificação	Etanol/Óleo de soja	6:1	<i>n</i> -heptano	100%/ 96 h/ 37 °C	(Salum et al., 2010)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Farelo de milho	Esterificação	Etanol/ Ácido oleico	5:1	<i>n</i> -heptano	94%/ 18 h/37 °C	(Fernandes et al., 2007)

BC – bagaço de cana; FSG – farelo de semente de girassol.

O emprego do sólido fermentado diretamente no meio reacional teve o seu primeiro relato descrito por Fernandes et al. (2007), avaliando a produção do biodiesel em reações de esterificação e transesterificação. Os autores produziram um sólido com atividade lipolítica a partir da fermentação do farelo de milho por *Burkholderia cepacia* e após o processo de liofilização, aplicaram-no na síntese de ésteres alcançando rendimentos 94% em 18 h na reação de esterificação do ácido oleico e de 95% em 120 h na reação de transesterificação do óleo de milho.

O presente trabalho teve fundamento a partir dessas perspectivas para produção do sólido fermentado com atividade lipolítica por *P. roqueforti* ATCC 10110 e posterior aplicação na síntese de ésteres. Também foi empregada a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em Accurel MP 1000 na síntese do oleato de etila em comparação ao sólido fermentado. A lipase de *Candida rugosa* tem sido amplamente relatada no desempenho de esterificação de ácidos graxos (ABDULLAH; SULAIMAN; KAMARUDDIN, 2009; PIRES-CABRAL; FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2010), esterificação estereosseletiva (FUKUI et al., 1990), hidrólise estereoespecífica (BRAUN; KLEIN; LÉPEZ, 1996), produção de fármacos (GOTO et al., 1996; KATO et al., 1996), pesticidas (BOSETTI et al., 1994) entre outros.

1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As lipases microbianas têm sido empregadas amplamente em reações de biocatálise para produção de compostos de interesse industrial. A produção enzimática atrelada a técnicas que minimizem custos, como a FES, reforça a compatibilidade do emprego desses biocompostos nesses tipos de reações. Alternativas que propõem a produção de enzimas, utilizando-se material de baixo custo, mesmo no caso dos resíduos agroindustriais, têm demonstrado grande impacto na síntese enzimática. A seleção do micro-organismo para produção de lipases é uma importante etapa no desenvolvimento do bioprocessamento, uma vez que a síntese de enzimas estará condicionada ao meio de cultivo que fornecerá nutrientes suficientes ao crescimento e manutenção do micro-organismo e, assim, aumento nos rendimentos da enzima de interesse.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, A. Z.; SULAIMAN, N. S.; KAMARUDDIN, A. H. Biocatalytic esterification of citronellol with lauric acid by immobilized lipase on aminopropyl-grafted mesoporous SBA-15. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 263–270, 2009.
- ALOULO, A.; RODRIGUEZ, J. A.; FERNANDEZ, S.; OOSTERHOUT, D. VAN; PUCCINELLI, D.; CARRIÈRE, F. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, p. 995–1013, 2006.
- BOSETTI, A.; BIANCHI, D.; PORTA, P. LA; BETTARINI, F.; MASSIMINI, S. Chemoenzymatic synthesis of optically pure 1,3,4-oxadiazol-2(3H)-ones with acaricidal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 11, p. 2596–2599, 1994.
- BOTTON, V.; PIOVAN, L.; MEIER, H. F.; MITCHELL, D. A.; CORDOVA, J.; KRIEGER, N. Optimization of biodiesel synthesis by esterification using a fermented solid produced by *Rhizopus microsporus* on sugarcane bagasse. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 4, p. 573–583, 2018.
- BRAMORSKI, A.; CHRISTEN, P.; RAMIREZ, M.; SOCCOL, C. R.; REVAH, S. Production of volatile compounds by the edible fungus *Rhizopus oryzae* during solid state cultivation on tropical agro-industrial substrates. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 359–362, 1998.
- BRAUN, B.; KLEIN, E.; LÉPEZ, J. L. Immobilization of *Candida rugosa* lipase to nylon fibers using its carbohydrate groups as the chemical link. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 51, n. 3, p. 327–341, 1996.
- BROCKMAN, H. L.; MOMSEN, W. E.; TSUJITA, T. Lipid-lipid complexes: Properties and effects on lipase binding to surfaces. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65, p. 891–896, 1988.
- CAO, L. Immobilised enzymes: Science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 217–226, 2005.
- CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; SANT'ANNA, G. L.; FREIRE, D. M. G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 239–247, 2000.
- CASTRO, H. F. DE; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v. 18, p. 544–554, 1995.
- COSTA, A. C. DOS S. **Aplicação de lipases comerciais e não-comerciais em reações de resolução cinética de álcoois secundários quirais**. 2014. 118 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, 2014.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, G. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623–630, 2004.

DHEEMAN, D. S.; FRIAS, J. M.; HENEHAN, G. T. M. Influence of cultivation conditions on the production of a thermostable extracellular lipase from *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 1–17, 2010.

DIAS, G. S.; LUZ, L. F. DE L.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Scale-up of biodiesel synthesis in a closed-loop packed-bed bioreactor system using the fermented solid produced by *Burkholderia lata* LTEB11. **Chemical Engineering Journal**, v. 316, p. 341–349, 2017.

DURAND, A.; RENAUD, R.; ALMANZA, S.; MARATRAY, J.; DIEZ, M.; DESGRANGES, C. Solid state fermentation reactors: From lab scale to pilot plant. **Biotechnology Advances**, v. 11, p. 591–597, 1993.

FERNANDES, M.; SAAD, E.; BOLZANI, E.; MEIRA, J.; RAMOS, L.; MITCHELL, D.; 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.

FERRAZ, J. L. DE A. A.; SOUZA, L. O.; SOARES, G. A.; COUTINHO, J. P.; OLIVEIRA, J. R. DE; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; FRANCO, M. Enzymatic saccharification of lignocellulosic residues using cellulolytic enzyme extract produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivated on residue of yellow mombin fruit. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 214–220, 2018.

FICKERS, P.; MARTY, A.; NICAUD, J. M. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 632–644, 2011.

FUKUI, T.; KAWAMOTO, T.; SONOMOTO, K.; TANAKA, A. Long-term continuous production of optically active 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid by yeast lipase in an organic solvent system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 330–334, 1990.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 85–101, 2003.

GHALY, A. E.; DAVE, D.; BROOKS, M. S.; BUDGE, S. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, p. 54–76, 2010.

GOTO, M.; NODA, S.; KAMIYA, N.; NAKASHIO, F. Enzymatic resolution of racemic ibuprofen by surfactant-coated lipases in organic media. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 7, p. 839–844, 1996.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Immobilization of β -galactosidase by bioaffinity adsorption on concanavalin A layered calcium alginate-starch hybrid beads for the hydrolysis of lactose from whey/milk. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 172–177, 2009.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235–251, 2006.

JAEGER, K.-E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315–351, 1999.

JAEGER, K.-E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; HEUVEL, M. VAN; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 29–63, 1994.

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

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: A review. **Adsorption**, v. 20, p. 801–821, 2014.

KATO, K.; KATAYAMA, M.; FUJII, S.; FUKAYA, H.; KIMOTO, H. Optical resolution of 2,2,2-trifluoro-1-(9-phenanthryl)ethanol via enzymatic alcoholysis of its activated ester. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, n. 3, p. 206–211, 1996.

KRISHNA, S. H.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S. G.; KARANTH, N. G. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 193–201, 2001.

LI, N.; ZONG, M. H. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 43–54, 2010.

LIMA, M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; BARATTI, J. C.; FILIPPIS, I. DE; FONTANA, J. D. 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.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M. I. M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, p. 105–110, 2003.

LIU, Y.; LI, C.; MENG, X.; YAN, Y. Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation. **Fuel Processing Technology**, v. 106, p. 303–309, 2013.

MADAMWAR, D.; PATEL, S. Formation of cellulases by co-culturing of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* on cellulosic waste. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 8, p. 183–186, 1992.

MASE, T.; MATSUMIYA, Y.; MATSUURA, A. Purification and characterization of *Penicillium roqueforti* IAM 7268 lipase. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n. 2, p. 329–330, 1995.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451–1463, 2007.

MIOSO, R.; MARANTE, F. J. T.; LAGUNA, I. H. B. DE. *Penicillium roqueforti*: A multifunctional cell factory of high value-added molecules. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 781–791, 2015.

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

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of solid state bioprocessing. **Biotechnology Annual Review**, v. 8, p. 183–225, 2002.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-State Fermentation Bioreactors**. Heidelberg: Springer, 2006.

MURTHY, M. V. R.; KARANTH, N. G.; RAO, K. S. M. S. R. Biochemical engineering aspects of solid-state fermentation. **Advances in Applied Microbiology**, v. 38, p. 99–147, 1993.

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

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

PANESAR, P. S.; PANESAR, R.; SINGH, R. S.; KENNEDY, J. F.; KUMAR, H. Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 530–543, 2006.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, p. 93–99, 2006.

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

PERIČIN, D. M.; MADAREV, S. Z.; RADULOVIĆ, L. M.; ŠKRINJAR, M. M. Exo-polygalacturonase production by *Penicillium roqueforti* on pumpkin oil cake in solid state fermentation. **Acta Periodica Technologica**, v. 38, p. 127–137, 2007.

PIRES-CABRAL, P.; FONSECA, M. M. R. DA; FERREIRA-DIAS, S. Esterification activity and operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams in the production of ethyl butyrate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 246–252, 2010.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 127–135, 2003.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 1–15, 1998.

- RAMESH, M. V.; LONSANE, B. K. Ability of a solid state fermentation technique to significantly minimize catabolic repression of α -amylase production by *Bacillus licheniformis* M27. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 591–593, 1991.
- REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147–148, p. 237–250, 2009.
- RIVERA-MUÑOZ, G.; TINOCO-VALENCIA, J. R.; SÁNCHEZ, S.; FARRÉS, A. Production of microbial lipases in a solid state fermentation system. **Biotechnology Letters**, v. 13, p. 277–280, 1991.
- ROBINSON, T.; NIGAM, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 197–203, 2003.
- RODRIGUES, D. S.; MENDES, A. A.; ADRIANO, W. S.; GONÇALVES, L. R. B.; GIORDANO, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, p. 100–109, 2008.
- ROMERO, C. M.; BAIGORÍ, M. D.; BARON, A. M.; KRIEGER, N.; PERA, L. M. Activity and stability of lipase preparations from *Penicillium corylophilum*: Potential use in biocatalysis. **Chemical Engineering and Technology**, v. 37, p. 1987–1992, 2014.
- SALUM, T. F. C.; BARON, A. M.; ZAGO, E.; TURRA, V.; BARATTI, J.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. An efficient system for catalyzing ester synthesis using a lipase from a newly isolated *Burkholderia cepacia* strain. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, n. 3, p. 197–203, 2008.
- SALUM, T. F. C.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; YAMAMOTO, C. I.; CÔCCO, L. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1348–1354, 2010.
- SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, p. 513–521, 1958.
- SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. Lipases and alpha/beta hydrolase fold. **Methods in enzymology**, v. 284, p. 85–107, 1997.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627–662, 2001.
- SILVA, T. P.; SOUZA, L. O.; SILVA, N. R.; ASSIS, S. A.; FERRERIA, M. L. O.; OLIVEIRA, J. R.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; FRANCO, M. Cultivation of *Penicillium roqueforti* in cocoa shell to produce and characterize its lipase extract. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 16, p. 745–756, 2017.
- SOARES, D.; PINTO, A. F.; GONÇALVES, A. G.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water

followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 15–23, 2013.

SOARES, D.; SERRES, J. D. D. S.; CORAZZA, M. L.; MITCHELL, D. A.; GONÇALVES, A. G.; KRIEGER, N. Analysis of multiphasic behavior during the ethyl esterification of fatty acids catalyzed by a fermented solid with lipolytic activity in a packed-bed bioreactor in a closed-loop batch system. **Fuel**, v. 159, p. 364–372, 2015.

SOUZA, L. O.; BRITO, A. R. DE; BONOMO, R. C. F.; SANTANA, N. B.; FERRAZ, J. L. DE A. A.; FERNANDES, A. G. DE A.; FERREIRA, M. L. O.; OLIVEIRA, J. R. DE; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; FRANCO, M. Comparison of the biochemical properties between the xylanases of *Thermomyces lanuginosus* (Sigma®) and excreted by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 during the solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2018.

TISCHER, W.; WEDEKIND, F. Immobilized enzymes: Methods and applications. **Biocatalysis – From Discovery to Application**, v. 200, p. 95–126, 1999.

YADAV, K. N. S.; ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; JADHAV, D. D.; THULASIRAM, H. V.; GOKHALE, D. V. Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10663–10670, 2011.

ZAGO, E.; BOTTON, V.; ALBERTON, D.; CÓRDOVA, J.; YAMAMOTO, C. I.; CÔCCO, L. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Synthesis of ethylic esters for biodiesel purposes using lipases naturally immobilized in a fermented solid produced using *Rhizopus microsporus*. **Energy and Fuels**, v. 28, p. 5197–5203, 2014.

CAPÍTULO II

Otimização da produção de lipase por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 em fermentação no estado sólido do bagaço de cana utilizando óleo de dendê de fritura

Resumo: No presente trabalho, foi investigada a influência de quatro meios de cultivo em fermentação no estado sólido (FES) para produção de lipase por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 e posterior otimização da FES. Os meios de cultivos foram: A – bagaço de cana, óleo de soja e solução nutriente; B – bagaço de cana com farelo de cacau, óleo de soja e solução nutriente; C – farelo de cacau, óleo de soja e solução nutriente; e D – farelo de cacau sem suplementação. A maior atividade de hidrólise de lipase, utilizando azeite de oliva como substrato, foi obtida com o meio A, no qual a atividade foi 62% maior que a obtida no meio D. Cultivos com dois diferentes óleos vegetais (óleo de soja e óleo de dendê de fritura) foram conduzidos a fim de avaliar a produção em função do tempo e investigar o efeito da composição destes na produção de lipase. A atividade máxima ($36,0 \pm 2,2$ e $44,8 \pm 3,7$ U g⁻¹ de sólido seco fermentado – U g⁻¹ SS) foi obtida em 72 e 84 h para o meio contendo óleo de soja e óleo de dendê de fritura, respectivamente, sendo que o meio contendo óleo de dendê de fritura apresentou a maior atividade lipolítica. Assim, o óleo de dendê de fritura foi empregado como fonte de carbono e indutor para o estudo de otimização, o qual foi realizado usando metodologia de superfície de resposta e as variáveis umidade inicial do substrato (UI) e fonte de carbono e indutor (FC&I). A maior atividade lipolítica ($52,5 \pm 4,9$ U g⁻¹ SS, a qual foi 13% maior do que a condição não otimizada) foi obtida com UI e FC&I de 80 e 23% (m m⁻¹), respectivamente. Este é o primeiro relato demonstrando o uso de sólido fermentado contendo lipase de *P. roqueforti* ATCC 10110.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido, Lipase, *Penicillium roqueforti* ATCC 10110, Óleo de dendê de fritura.

Optimization of lipase production by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 through the solid-state fermentation of sugarcane bagasse using frying palm oil

Abstract: In the present work, the influence of four solid-state fermentation (SSF) culture media for lipase production by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 and the subsequent optimization of the SSF was investigated. The culture media were: A – sugarcane bagasse, soybean oil and nutrient solution; B – sugarcane bagasse with cocoa bean shell, soybean oil and nutrient solution; C – cocoa bean shell, soybean oil and nutrient solution; and D – cocoa bean shell without supplementation. The highest hydrolytic activity of lipase, with olive oil as substrate, was obtained with the medium A, in which the activity was 62% higher than that obtained in medium D. Cultivations with two different vegetable oils (soybean oil and frying palm oil) were carried out to evaluate the production as a function of time and to investigate the effect of the composition of these ones in the production of lipase. The maximum activity ($36,0 \pm 2,2$ and $44,8 \pm 3,7$ U g⁻¹ of dry fermented solid – U g⁻¹DS) was achieved at 72 and 84 h for the medium containing soybean oil and frying palm oil, respectively, and the last one with frying palm oil presented the highest hydrolytic activity of lipase. Thus, frying palm oil was used as both carbon source and inducer for the optimization study, which was done using response surface methodology and the variables initial substrate moisture (ISM) and frying palm oil concentration (FPO). The highest lipase activity (52 ± 5 U g⁻¹DS, which was 13% higher than that non-optimized condition) was obtained with ISM and FPO of 80 and 23% (w/w), respectively. This is the first report demonstrating use of fermented solid containing lipase from *P. roqueforti* ATCC 10110.

Keywords: Solid-state fermentation, Lipase, *Penicillium roqueforti* ATCC 10110, Frying palm oil.

2.1 INTRODUÇÃO

O reaproveitamento de resíduos agroindustriais, atrelado a técnicas de baixo custo para produção de metabólitos, em especial as enzimas, tem sido investigado nos últimos anos (FERREIRA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017; SANTOS et al., 2016). Nesse contexto, a fermentação em estado sólido (FES) desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além de elevado valor agregado (GERVAIS; MOLIN, 2003). O termo FES, segundo Raimbault (1998) e Mitchell, Krieger e Berovic (2006), aplica-se ao processo de crescimento de micro-organismos em substratos sólidos na ausência de água livre. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas.

De todos os parâmetros que influenciam o processo fermentativo, a água apresenta papel de destaque na FES, em virtude do seu elevado grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida (PANDEY, 2003). Diferentes tipos de micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos (AIDOO; HENDRY; WOOD, 1982). Contudo, são os fungos filamentosos os mais adaptáveis a esse tipo de processo, pois são capazes de crescerem com pouca água e muitos sólidos presentes, além de sua forma de crescimento, por meio de hifas, favorecer a colonização do meio (DURAND, 2003). Esse fato se traduz na grande quantidade de aplicações e produtos obtidos pelo emprego desses micro-organismos.

Dentre a vasta produção de metabólitos secretados pelos micro-organismos em FES, destacam-se as lipases (triglicerolacil-hidrolases EC 3.1.1.3), classificadas como hidrolases que atuam sobre ligações ésteres presentes em acilgliceróis, liberando diglicerídeos, monoglicerídeos, glicerol e ácidos graxos (VILLENEUVE et al., 2000). Neste sentido, o emprego de biocatalisadores em reações para síntese de compostos têm sido exaustivamente investigado devido aos ínfimos resíduos gerados ao final das reações (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014; GULDHE et al., 2015). Por se tratar de um biocomposto de alto valor comercial, alternativas têm sido empregadas para minimização na obtenção deste biocatalisador. Nessa perspectiva, a FES se destaca como uma das possibilidades para produção em menor custo na

síntese de lipase. Entretanto, fatores como umidade e fonte de carbono são parâmetros que devem ser, cuidadosamente, estudados para maximização da produção enzimática. Diversos autores têm relatado o aumento expressivo na síntese de lipase frente a diferentes tipos de indutores devido à composição diferenciada proporcionada por este fator (BOTTON, 2014; LIMA et al., 2003; PINOTTI et al., 2017).

Diante disso, a análise multivariada que, de forma genérica, refere-se a todos os métodos estatísticos que analisam, concomitantemente, as variáveis envolvidas em um processo de otimização a fim de maximizar a variável resposta com a menor quantidade possível de experimentos que por consequência reduzem a quantidade de resíduos químicos gerados (PEREIRA-FILHO, 2017), foi empregado na otimização das variáveis independentes umidade inicial (UD) e fonte de carbono e indutor (FC&I), no presente trabalho, possibilitando a maximização da variável dependente atividade de hidrólise.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Tecnologia Enzimática (LTEB) do Departamento de Química (UFPR) e no Laboratório de Biotransformação e Biocatálise Orgânica (LaBioCat) do Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas (UESC).

2.2.1 Obtenção e cultivo do micro-organismo

O micro-organismo utilizado para os ensaios de fermentação foi o *P. roqueforti* ATCC 10110, o qual foi obtido da coleção de micro-organismos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz, Manguinhos, RJ, Brasil) sob o registro de número 40074 e lote 041140074. Este fungo vem sendo preservado em meio de sílica e glicerol a -80 °C em ultrafreezer. A repicagem das cepas foi feita em meio de cultura de ágar-dextrose-batata (PDA) em placas de Petri, previamente esterilizados em autoclave vertical a 121 °C por 15 min. As placas inoculadas foram incubadas em câmara de germinação BOD com temperatura controlada de 25 °C por 7 dias ou até esporulação abundante (observado visivelmente devido a coloração verde da colônia) sendo, posteriormente, conservadas a 4 °C para utilização posterior.

2.2.2 Preparo do inóculo

O preparo da suspensão de esporos foi realizado utilizando-se o micro-organismo cultivado em meio PDA por 7 dias a 25 °C. Após o período de incubação, a cultura esporulada foi submetida a uma raspagem com auxílio de pérolas de vidro e suspensa em solução Tween 80 (0,01%, v/v), ambos previamente esterilizados em autoclave vertical a 121 °C por 15 min. A suspensão foi coletada em frasco Erlenmeyer e uma alíquota de 0,1 mL foi tomada e diluída em tubo de ensaio para a contagem do número de esporos em microscópio binocular utilizando câmara de Neubauer.

2.2.3 Ensaios preliminares

Os estudos foram divididos em três etapas: seleção dos substratos na FES, cinética de fermentação e a otimização das variáveis umidade inicial (% m m⁻¹, base úmida) e fonte de carbono e indutor (% m m⁻¹, substrato seco) do processo através do delineamento composto central rotacional (DCCR).

2.2.4 Substratos

Os substratos utilizados na FES foram o bagaço de cana (BC), farelo de cacau (FC), óleo de soja (OS) e óleo de dendê de fritura (ODF), o qual foi utilizada apenas nos ensaios envolvidos na otimização do bioprocesso. O ODF e o FC foram fornecidos por indústrias do sul da Bahia e o BC foi fornecido pela Usina de Álcool Melhoramentos Jussara-PR.

2.2.4.1 Seleção dos substratos

Nesta etapa foram realizados ensaios para determinação do melhor meio de cultivo para produção de lipases por *P. roqueforti* ATCC 10110 em FES.

Inicialmente, foram realizados 4 cultivos descritos nos itens 2.2.4.2 e 2.2.4.3, a fim de avaliar o potencial do fungo *P. roqueforti* ATCC 10110 na produção de lipases nas condições de cada ensaio. Em seguida, foi realizada uma cinética de crescimento (ITEM 2.2.6), nas condições descritas por Silva et al. (2017), a fim de selecionar o melhor tempo de incubação.

2.2.4.2 Fermentação em estado sólido (FES) com farelo de cacau

Para a fermentação com farelo de cacau, seguiu-se as condições otimizadas em nosso grupo de pesquisa. Utilizou-se Erlenmeyers de 250 mL, contendo 5 g do substrato, que em seguida foram autoclavados a 121 °C e 1,0 atm de pressão por 15 minutos. Após o resfriamento, foi inoculado sobre o farelo de cacau a suspensão de esporos na concentração de 10^7 esporos g^{-1} de farelo e umedecido com água destilada estéril. As variações de quantidade de água foram determinadas pela variável atividade de água (a_w), sendo esta aferida em equipamento LABSWIFT - Novasina (TECNAL). Os frascos inoculados foram incubados em estufa a 27 °C por 60 h (SILVA et al., 2017).

2.2.4.3 Diferentes meios adotados em FES

Para esta etapa, adotou-se metodologia empregada no grupo de pesquisa do LTEB do Departamento de Química da UFPR, a qual teve como finalidade produzir um sólido fermentado com maior atividade lipolítica, com os seguintes meios de cultivo em estado sólido: **a)** farelo de cacau, óleo de soja e solução nutriente; **b)** uma mistura de farelo de cacau e bagaço de cana (1:1, m m^{-1}), óleo de soja e solução nutriente; **c)** bagaço de cana, óleo de soja e solução nutriente. Os cultivos foram realizados com o meio descrito por Rodriguez et al. (2006). Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 5 g de substrato sólido (base seca) que foram impregnados com 10 mL de uma solução nutriente, cuja composição está descrita no item 2.2.5. Após resfriamento, o substrato sólido foi inoculado com o volume requerido da suspensão de esporos, preparada como descrito no item 2.2.2, para se obter $3,7 \times 10^7$ esporos g^{-1} SS (grama de substrato seco). O teor de umidade inicial do sólido foi ajustado levando-se em consideração a capacidade absorviva de cada matriz sólida empregada e, também, os protocolos estabelecidos por Silva et al. (2017) e Botton (2014). Sendo 75%, meio (a), e 80% para os demais meios (b e c). A umidade foi determinada em balança de infravermelho Bel modelo Top Ray (Monza, inc., Itália) conforme descrito em 2.2.8.1. Para o meio (b), avaliou-se o efeito do tamanho das partículas do BC com o FC no cultivo sólido. Os frascos inoculados foram incubados em estufa a 27 °C durante 60 h.

2.2.5 Preparo da solução nutriente

A solução nutriente foi preparada segundo Rodriguez et al. (2006) e continha a seguinte composição: ureia (4 g L^{-1}), lactose (5 g L^{-1}), K_2HPO_4 (5 g L^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g L^{-1}) e solução de oligoelementos (4 mL L^{-1}). O valor de pH da solução mineral foi ajustado para 7,0 com HCl a 10% (v/v). O óleo de soja ou óleo de dendê de fritura, nas proporções determinadas no experimento, foram adicionados a esta solução que, em seguida, foi emulsionada em vórtex por 1 min. A solução de oligoelementos tinha a seguinte composição: EDTA (10 g L^{-1}), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2 g L^{-1}), $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($2,8 \text{ g L}^{-1}$), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,5 \text{ g L}^{-1}$), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,2 \text{ g L}^{-1}$), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,3 \text{ g L}^{-1}$). A fim de dissolver os componentes, o pH da solução de oligoelementos foi ajustado para 4,0 com HCl a 10% (v/v).

2.2.6 Cinética da produção de atividade do sólido fermentado

Após determinação do melhor meio de cultivo para produção de lipase, foi traçada uma cinética de fermentação utilizando dois diferentes óleos (ODF e OS) como fonte de carbono e indutor e solução nutriente. Essa cinética foi analisada a fim de se encontrar a maior atividade de hidrólise e o melhor tempo de cultivo. Para isso, realizou-se um perfil durante 96 horas a $27 \text{ }^\circ\text{C}$ e 80% de umidade. A cada 12 horas uma amostra foi retirada e determinada a atividade lipolítica do sólido fermentado seco. As análises foram conduzidas em triplicata.

Para todas as etapas deste trabalho, a atividade de hidrólise do sólido fermentado foi avaliada usando o óleo de oliva como substrato-padrão.

2.2.7 Otimização das condições de cultivo utilizando delineamento composto central rotacional

Após determinação do tempo necessário para máxima produção de lipase, foi realizado um delineamento DCCR para a otimização das condições de cultivo. Avaliou-se os fatores umidade inicial ($\% \text{ m m}^{-1}$, base úmida) – X_1 e fonte de carbono e indutor ($\% \text{ m m}^{-1}$, substrato seco) – X_2 como variáveis independentes. Esses fatores foram avaliados juntos aos seus níveis mais adequados para máxima produção enzimática. A variável-resposta estudada foi a atividade de hidrólise do sólido seco

fermentado ($\text{U g}^{-1}\text{SS}$). Empregou-se uma matriz DCCR 2^2 (TABELA 2.1) com adição de 4 pontos axiais (+1,41 e -1,41) e 4 pontos centrais (0) com o propósito de estimar o erro experimental, avaliar efeitos quadráticos, lineares e de interação das variáveis e para ajustar um modelo de segunda ordem com termos quadráticos.

O nível de significância estatística do modelo gerado foi avaliado por análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$), os coeficientes de regressão foram avaliados a partir dos efeitos padronizados (com base em t-Student, $p < 0,05$) e a qualidade do modelo avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de determinação ajustado ($R^2\text{-adj}$) e teste de falta de ajuste. Foi utilizado o software Statistica versão 10 (STATSOFT) para análise dos dados e elaboração dos gráficos.

Tabela 2.1 – Variáveis e níveis do planejamento DCCR para a otimização da produção de lipase em fermentação no estado sólido

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1,00	0,00	1,00	1,41
X_1 : umidade ($\% \text{ m m}^{-1}$, base úmida)	73,00	75,00	80,00	85,00	87,00
X_2 : Fonte de C e indutor ($\% \text{ m m}^{-1}$)*	19,00	20,00	22,50	25,00	26,00

*A concentração é dada em relação à quantidade de substrato seco.

2.2.8 Métodos analíticos

2.2.8.1 Determinação da umidade

A umidade dos sólidos fermentados foi determinada em uma balança com secagem por iluminação infravermelha (Gehaka, São Paulo, Brasil), utilizando 1,0 g de amostra. A temperatura utilizada foi de 105 °C e a medida foi programada para terminar quando a variação entre leituras de massa subsequentes fosse menor que 0,05% (m m^{-1}).

2.2.8.2 Secagem do sólido fermentado

Após os cultivos, o sólido fermentado foi seco em liofilizador (modelo 60, Jouan LP3, Frederiksberg, Dinamarca) a -45 °C e 0,1 mbar, por 24 h. Este sólido fermentado seco foi utilizado diretamente nas determinações de atividade de hidrólise.

2.2.8.3 Dosagem de atividade de hidrólise

A dosagem de atividade lipolítica de hidrólise foi realizada adicionando o sólido fermentado úmido ou o sólido fermentado seco diretamente no meio reacional, pelo método titulométrico em titulador automático do tipo pHStat (modelo 718 Stat Titrino, Metrohm, Herisau, Suíça). Para os ensaios, foi preparada uma emulsão com água destilada, goma arábica (3%, m v⁻¹), Tris-HCl (2,5 mmol L⁻¹, pH 7,0), CaCl₂ (2 mmol L⁻¹), NaCl (150 mmol L⁻¹) e o substrato óleo de oliva (67 mmol L⁻¹) (TISS; CARRIÈRE; VERGER, 2001). Essa mistura foi homogeneizada em liquidificador por 15 min e por mais 1 min imediatamente antes do uso. Para cada ensaio, 150 mg de sólido fermentado seco, juntamente com 20 mL da emulsão, foram adicionados em um vaso reacional termostatizado (40 °C), sob agitação magnética. O meio reacional foi ajustado automaticamente para pH 7,0 com uma solução de NaOH (0,05 mol L⁻¹) e, então, a reação foi seguida por 5 min. As análises realizadas por esse método foram feitas em triplicata e a atividade de hidrólise foi calculada com base na velocidade inicial, que corresponde ao coeficiente angular da reta ajustada aos pontos iniciais de um gráfico de volume de NaOH (mL) em função do tempo (s).

Uma unidade de atividade de hidrólise (U) foi definida como equivalente a 1 μmol de ácidos graxos liberados por min, nas condições do ensaio. A atividade de hidrólise foi expressa como unidades de atividade por grama de sólido fermentado seco (U g⁻¹SS).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Ensaios preliminares

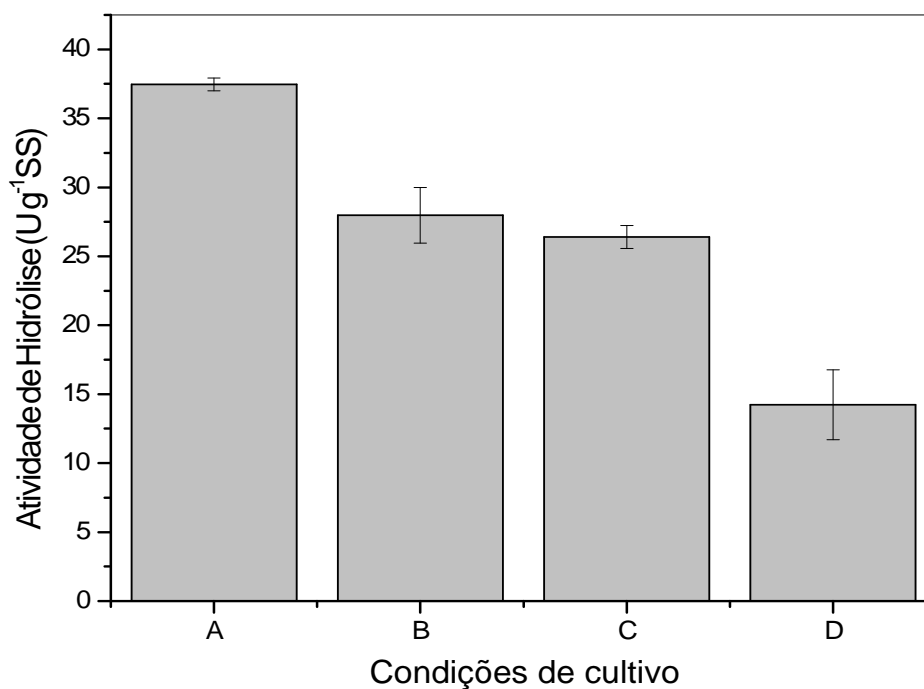
2.3.1.1 Seleção dos substratos

As respostas obtidas nesta etapa, a partir dos diferentes substratos empregados em FES por *P. roqueforti* ATCC 10110, podem ser observadas na Figura 2.1. Os valores apresentados são a média da triplicata dos cultivos ± o erro padrão da média.

Em uma análise preliminar da Figura 2.1, foi possível constatar que os sólidos produzidos nas três condições (A, B e C) propostas para aumento da atividade de

lipase no tempo de 60 h de cultivo para *P. roqueforti* ATCC 10110, anteriormente estudado por Silva et al. (2017), apresentaram-se com valores superiores ao encontrado pelos referidos autores, sendo $37,5 \pm 0,5$, $28,0 \pm 2,0$, $26,0 \pm 0,4$ e $14 \pm 2,5$ U g⁻¹SS, respectivamente para os meios A, B, C e D. Os resultados alcançados por Silva et al. (2017) no cultivo sólido do farelo de cacau por *P. roqueforti*, reproduzidos neste estudo, foram avaliados de forma comparativa em relação aos outros meios de cultivo (FIGURA 2.1), que de forma satisfatória, evidenciaram uma maior produção de lipase frente à variabilidade e composição dos diferentes substratos.

Figura 2.1 – Atividade de hidrólise do sólido fermentado de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 produzido por fermentação em estado sólido frente a diferentes substratos



Condições de cultivo: (A) bagaço de cana umedecido com solução nutriente e óleo de soja como fonte de carbono e indutor; (B) bagaço de cana e farelo de cacau 1:1 (m m⁻¹) umedecido com solução nutriente e óleo de soja como fonte de carbono e indutor; (C) farelo de cacau umedecido com solução nutriente e óleo de soja como fonte de carbono e indutor; (D) farelo de cacau sem suplementação conforme descrito por Silva et al. (2017). O teor de umidade foi de 80% para o meio A e B e de 75% para os demais. Em todos os cultivos, a temperatura e o tempo de incubação foram fixados em 27 °C e 60 h, respectivamente. Determinação da atividade de hidrólise: óleo de oliva, 150 mg de sólido fermentado úmido a 40 °C. Os valores apresentados são a média da triplicata dos cultivos ± o erro padrão da média (EPM).

A fim de se aumentar a produção de lipase, empregou-se suplementação ao cultivo. Silva et al. (2017) obtiveram (sem suplementação) 17,93 U g⁻¹ para atividade lipolítica em sua condição ótima. Amorim et al. (2012), também, utilizando farelo de cacau em FES, sem suplementação, por *Aspergillus niger* obtiveram valor máximo de

atividade de lipase de $11,67 \text{ U g}^{-1}$, ligeiramente, próximo ao encontrado por Silva et al. (2017), o que reforça o uso de suplementação para aumento da atividade enzimática. Nesse sentido, avaliou-se, também, o efeito de uma solução nutriente no cultivo sólido conforme descrito por Rodriguez et al. (2006).

Partindo-se do pressuposto que a produção de lipases está condicionada à composição do meio de cultivo, o tipo de técnica empregada etc. (Mitchell, Krieger e Berovic, 2006), adotou-se o óleo de soja como fonte de carbono e indutor e a solução nutriente para esses ensaios envolvidos na seleção dos substratos. A partir de resultados obtidos anteriormente por Botton (2014), estudando o percentual de óleo de soja sobre o bagaço de cana em FES por *Rhizopus microsporus*, onde a condição para máxima produção enzimática se deu com 20% de OS, adotou-se a concentração estudada por Botton (2014) para os ensaios mostrados na Figura 2.1.

Comparativamente, os valores diferenciados entre a condição (C) e o determinado por Silva et al. (2017) (D), podem ser prontamente explicados pela diferenciação da composição do meio de cultivo, onde (C) apresentou maior atividade de hidrólise, o que pode estar relacionado à adição de OS (fonte de C e indutor) e da solução nutriente, que, certamente, forneceram componentes essenciais para o crescimento e manutenção do micro-organismo e, conseqüentemente, maior produção de lipases. Analogamente, o sólido do meio de cultivo (B), também, apresentou maior atividade de hidrólise em relação ao meio (D), embora não tenha apresentado diferença significativa em relação ao sólido (C), o que seria notadamente compreensível, devido à adição do bagaço de cana ao cultivo, que possivelmente promoveria uma descompactação entre as partículas do farelo de cacau e permitiria maior difusão de gases no biorreator e, por conseqüência, um crescimento homogêneo na superfície e na parte interna da matriz sólida, secretando assim maior quantidade de enzimas (SALUM et al., 2010; SOARES et al., 2013). Contudo, o sólido do meio de cultivo (A), onde houve apenas o bagaço de cana como matriz, apresentou maior atividade de hidrólise. Embora o farelo de cacau apresente nutrientes suficientes (proteínas, gorduras, carboidratos, metilxantinas etc.) (OKIYAMA; NAVARRO; RODRIGUES, 2017) para o crescimento e desenvolvimento de micro-organismos e produção de diversos metabólitos (LESSA et al., 2017; SILVA et al., 2017), não foi observado neste estudo um comportamento favorável à produção de lipases, fator evidenciado na Figura 2.1. Isso pode estar relacionado à composição do farelo de cacau, rico em açúcares como glicose, que é uma fonte de carbono menos

complexa ao micro-organismo em comparação a indutores como óleos, o que, nesse sentido, pode ter inibido a produção de lipases.

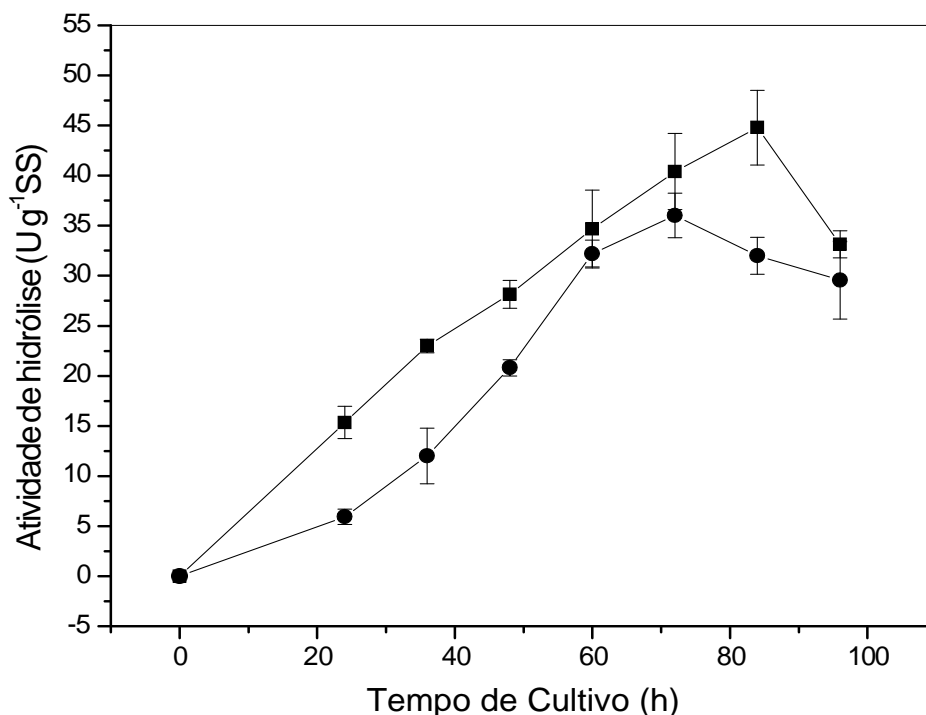
Com base nestes resultados, optou-se por dar continuidade, apenas, ao meio de cultivo (A) que apresentou $37,5 \pm 0,5$ U g⁻¹SS para atividade de hidrólise, o que corresponde a cerca de 62% de aumento em relação ao meio cultivado nas condições determinadas por Silva et al. (2017). Assim, na etapa seguinte, foi traçada uma cinética da produção de lipase nas condições do meio com maior atividade lipolítica para verificar se a máxima atividade de lipase corresponderia ao tempo estudado na seleção dos substratos.

2.3.2 Cinética da produção de atividade do sólido fermentado

Como já mencionado, a cinética de produção foi conduzida com a finalidade de obter-se o tempo ótimo para máxima produção de lipase. A partir de resultados obtidos pelo grupo de pesquisa LTEB da UFPR, estabeleceu-se um teor de umidade suficiente para o crescimento de fungos, que comparativamente, encontra-se dentro de valores ideais de a_w para o crescimento do gênero *Penicillium*, conforme descrito por Ayerst (1969). Como definido na etapa anterior (2.3.1.1), exceto pela inclusão dos cultivos contendo ODF com o propósito de avaliar a influência de diferentes fontes de carbono na produção de lipase, foi utilizado o meio de cultivo composto por bagaço de cana a 80% de umidade (m m⁻¹, base úmida), solução nutriente, óleo de soja ou óleo de dendê de fritura, ambos a 20% (m m⁻¹, substrato seco) e temperatura de 27 °C, conforme descrito em manual de cultivo enviado pela FIOCRUZ e padronizações realizadas com o fungo *P. roqueforti* ATCC 10110 em diferentes matrizes sólidas em nosso grupo de pesquisa (FERRAZ et al., 2018; LESSA et al., 2017; SILVA et al., 2017). A Figura 2.2 apresenta a cinética do cultivo sólido do bagaço de cana pelo *P. roqueforti* ATCC 10110 nas condições já mencionadas no item 2.2.6.

Os sólidos produzidos nas condições supracitadas apresentaram atividade de hidrólise máxima em 72 h ($36,0 \pm 2,2$ U g⁻¹SS) e 84 h ($44,8 \pm 3,7$ U g⁻¹SS) para os meios contendo OS e ODF, respectivamente (FIGURA 2.2). Para os cultivos contendo OS houve uma queda após 72 h de incubação. Entretanto, para os ensaios contendo ODF o decréscimo foi observado a partir de 84 h de cultivo.

Figura 2.2 – Cinética de produção de lipase durante o cultivo em estado sólido por *P. roqueforti* ATCC 10110



Fonte de carbono e indutor: (■) óleo de dendê de fritura; (●) óleo de soja. Os cultivos foram conduzidos à temperatura de 27 °C a 80% de umidade. Determinação da atividade de hidrólise: óleo de oliva, 150 mg de sólido fermentado úmido a 40 °C Os valores apresentados são a média da triplicata dos cultivos ± EPM. Nos casos em que a barra do EPM não aparece, significa que esta é menor que símbolo que a representa.

O tempo determinado para a maior produção de lipases pode estar relacionado à fase de crescimento onde houve maior absorção dos nutrientes presentes no meio de cultivo pelo micro-organismo. Quando a quantidade de nutrientes é reduzida por consequência da metabolização destes pelo fungo, inevitavelmente há um decréscimo na síntese de metabólitos (SANTOS et al., 2012). Outro fator que também pode ter contribuído para o decréscimo da atividade de hidrólise após 72 e 84 h (FIGURA 2.2) para cada meio de cultivo seria a produção/aumento de proteases durante o bioprocessamento, o que também já foi relatado por (FREIRE et al., 1997). Baseado na composição em ácidos graxos de OS e ODF é possível inferir que os valores para as máximas atividades encontradas serem, em quase todos os pontos, para os cultivos contendo ODF, pode estar relacionado à presença majoritária de ácido palmítico e oleico, o que sugere uma preferência pelo *P. roqueforti* ATCC 10110 por ácidos graxos de cadeia mais curta e com menos insaturações ou nenhuma (LIMA et al., 2003). Em contrapartida, os cultivos que apresentaram menores valores de atividade de lipase

foram aqueles conduzidos com OS, cuja composição dá-se, em maior escala, por ácido linoleico e logo após o oleico, que são insaturados.

2.3.3 Otimização das condições de cultivo utilizando delineamento composto central rotacional

Após determinação do tempo ótimo nas condições da cinética de cultivo, foi realizado um planejamento DCCR para otimização das variáveis do bioprocessamento para produção de lipase. As respostas obtidas podem ser observadas na Tabela 2.2, que são o resultado médio da triplicata realizada nos ensaios de determinação da atividade lipolítica e expressos em $U\ g^{-1}SS$.

Tabela 2.2 – Variáveis, níveis e resultados experimentais do delineamento composto central rotacional aplicado à otimização das condições de cultivo sólido por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 para produção de lipase

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1,00	0,00	1,00	1,41
X ₁ : umidade (% m m ⁻¹ , base úmida)	72,95	75,00	80,00	85,00	87,05
X ₂ : Fonte de C e indutor (% m m ⁻¹)*	18,98	19,50	22,50	25,00	26,03
Ensaio	X ₁	X ₂	Ativ. de lipase (U g ⁻¹ SS)		
1	0,00	1,41	37,47		
2	0,00	-1,41	27,95		
3	0,00	0,00	50,94		
4	1,00	1,00	54,19		
5	0,00	0,00	48,25		
6	-1,00	1,00	31,57		
7	1,41	0,00	59,34		
8	1,00	-1,00	46,68		
9	0,00	0,00	52,26		
10	-1,41	0,00	37,08		
11	0,00	0,00	52,91		
12	-1,00	-1,00	31,28		

*A concentração é dada em relação à quantidade de substrato seco.

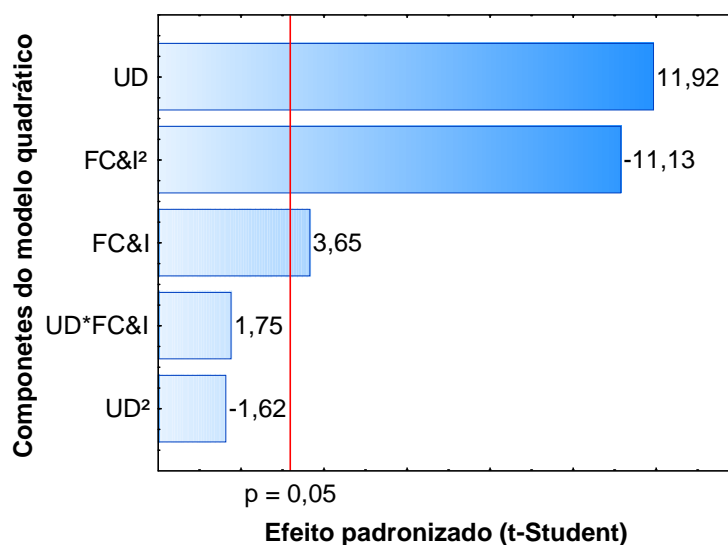
Foi possível verificar, a partir de análise prévia da Tabela 2.2, que o fungo *P. roqueforti* ATCC 10110 foi capaz de produzir lipases em todos os ensaios envolvidos no planejamento. A variabilidade na produção desta enzima em cada ponto estudado, deve-se, em caráter majoritário, a umidade no cultivo e à concentração da fonte de carbono e indutor utilizado em cada experimento. Alguns estudos já foram conduzidos na produção de lipases, celulases, xilanases etc., utilizando o fungo *P. roqueforti*

ATCC 10110, o que demonstra seu potencial no emprego em cultivo sólido para produção enzimática (FERRAZ et al., 2018; LESSA et al., 2017; SILVA et al., 2017).

Os valores experimentais para atividade lipolítica variaram entre 27,95 e 59,34 U g⁻¹SS, sendo a predominância máxima para atividade enzimática encontrada no ponto central (experimentos 3, 5, 9 e 11). Neste aspecto, as variáveis umidade e fonte de carbono foram mantidas em 80 e 22,50% (m m⁻¹), respectivamente.

Para avaliar estatisticamente as variações nas respostas presentes na Tabela 2.2, os resultados foram submetidos à análise de regressão para ajustar modelos polinomiais de segunda ordem. A significância estatística dos termos quadráticos (Q), lineares (L) e de interação (L x L) foi disposta em forma de gráfico de Pareto (FIGURA 2.3). Neste tipo de gráfico, o valor absoluto da amplitude do efeito padronizado (relação entre o efeito e o erro normal) de cada um dos coeficientes é traçado em ordem decrescente e comparada com magnitude de um fator estatisticamente significativo (SANTOS et al., 2016). Estabelecendo-se um nível de confiança de 95%, representado pela linha vertical traçada, apenas os termos UD (umidade linear), FC&I² (fonte de carbono e indutor quadrático) e FC&I (fonte de carbono e indutor linear) foram significativos. Tendo em vista a presença de termos não significativos para o modelo, os coeficientes de regressão destes foram removidos e um novo modelo reduzido foi construído por análise de regressão e submetido à ANOVA ($p < 0,05$) (TABELA 2.3).

Figura 2.3 – Diagrama de Pareto



Significância dos efeitos estimados das variáveis estudadas sobre a resposta atividade de hidrólise no delineamento composto central rotacional aplicado à otimização das condições no cultivo sólido para produção de lipases por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110.

Tabela 2.3 – ANOVA para o modelo reduzido ajustado

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F	p
Regressão	1177,40	3	392,47	67,10	< 0,0001
Resíduo	46,79	8	5,85		
Falta de ajuste	34,04	5	6,81	1,60	0,3707
Erro puro	12,76	3	4,25		
Total	1224,20	11			

$R^2 = 0,9816$; $R^2\text{-adj} = 0,9474$; GL, graus de liberdade; SQ, soma dos quadrados; QM, quadrado médio; F, teste de Fisher; p, probabilidade.

Ao nível de 95% de confiança, um p-valor para regressão menor que 0,05 sugere um modelo estatisticamente significativo. Em termos qualitativos, o modelo pode ser avaliado com base no coeficiente de determinação (R^2), pelo coeficiente de determinação ajustado ($R^2\text{-adj}$) e através da falta de ajuste. O valor de R^2 se estabelece pela variabilidade da variável dependente (resposta, Y) que se relaciona às variações presentes nas variáveis independentes (X's). Contrariamente, valores altos de R^2 podem estar relacionados (no caso de inclusão de muitas variáveis com baixo valor explicativo) à presença de muitos termos não significativos que, por sua vez, podem contribuir de forma indiscriminada no aumento do valor de R^2 . Nesse sentido é que se faz uso do $R^2\text{-ajustado}$, pois este leva em consideração apenas os termos que de fato exercem papel significativo e possuem alto valor de previsão (FERRAZ et al., 2018). Um modelo bem ajustado (sem falta de ajuste) é capaz de prever, com eficiência, resultados em condições não estudadas, mas que estejam dentro do domínio experimental.

Assim, baseado na Tabela 2.3, foi possível constatar que o modelo reduzido gerado ($p < 0,0001$) foi estatisticamente significativo. Os valores de R^2 e $R^2\text{-adj}$ (0,9816 e 0,9474, respectivamente) evidenciaram um bom ajuste do modelo aos resultados experimentais. Sendo o valor de R^2 de 0,9816, o que indica 98,16% da variação explicada pelo modelo reduzido. O valor de falta de ajuste ($p = 0,3707$) não foi significativo para o modelo. A fim de potencializar o bom ajuste do modelo gerado, foram avaliados (FIGURA 2.4) o gráfico de valores observados em função dos valores preditos e o gráfico de resíduos. Foi possível verificar na Figura 2.4a, a proximidade dos pontos em relação à reta diagonal, o que indica, também, bom ajuste do modelo. Já na Figura 2.4b foi possível constatar que os resíduos estão dispostos de forma

aleatória, caracterizando-os como homocedásticos e, novamente, corroborando o bom ajuste do modelo aos valores experimentais (PEREIRA-FILHO, 2017).

Figura 2.4 – Gráfico de resíduos

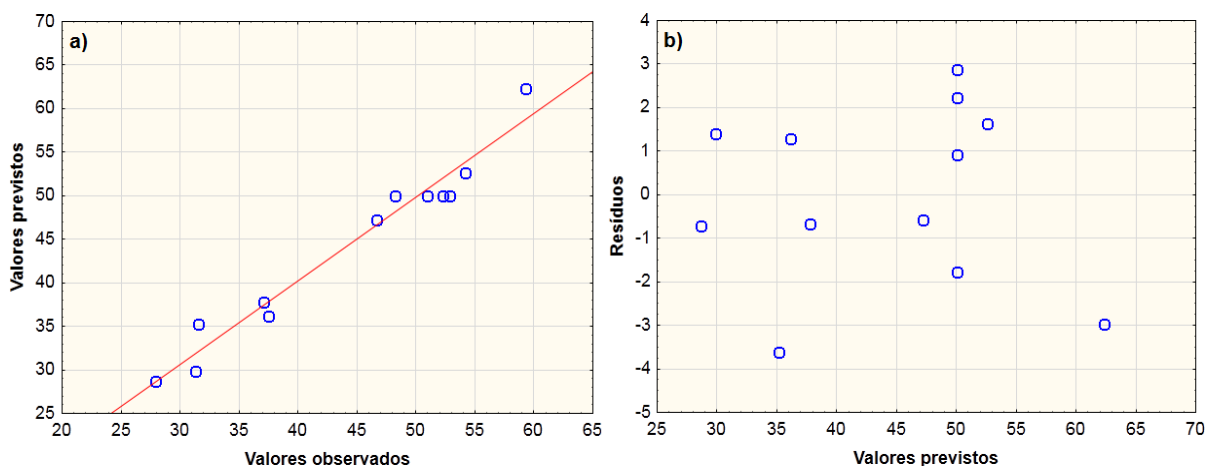


Gráfico de valores reais x preditos (a) e gráfico de resíduos (b) para o modelo reduzido ajustado utilizado no cultivo sólido por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110.

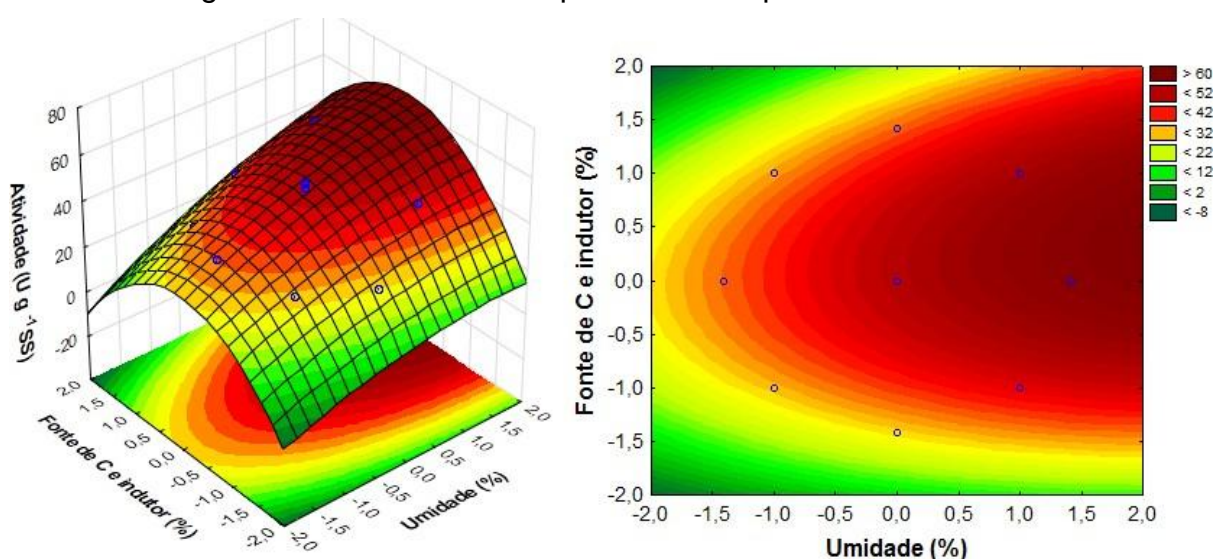
A partir das variáveis estudadas, foi possível obter a Equação 1 que representa o modelo polinomial de segunda ordem, onde A_H representa a atividade de hidrólise do sólido fermentado; UD e FC&I representam as variáveis independentes umidade e fonte de carbono e indutor, respectivamente. Para a equação que descreve o modelo, apenas os termos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) foram considerados.

$$A_H = 51,09 + 8,67UD + 2,66FC\&I - 9,07FC\&I^2 \quad (1)$$

A partir da equação do modelo, foram gerados os gráficos de superfície de resposta e de contorno (FIGURA 2.5), que ilustram o efeito das variáveis.

Foi possível observar na figura 2.5 as regiões que resultaram em valores máximos de atividade de hidrólise. As condições ótimas obtidas a partir do modelo reduzido para atividade enzimática foram: 80% de umidade ($m\ m^{-1}$, base úmida) e 22,86% de fonte de carbono e indutor ($m\ m^{-1}$, substrato seco). Nestas condições, o modelo apresentou atividade de hidrólise teórica máxima de $51,3\ U\ g^{-1}SS$.

Figura 2.5 – Gráficos de superfície de resposta e de contorno



Os gráficos construídos representam o efeito de interação entre a variável umidade e fonte de carbono e indutor, sendo a resposta a atividade de hidrólise do sólido fermentado.

Para validação do modelo, as condições previstas para o ponto crítico foram conduzidas em triplicata. A atividade média de hidrólise de $52,5 \pm 4,9 \text{ U g}^{-1}\text{SS}$ (cerca de 13% maior do que a condição não otimizada) obtida na validação ficou bastante próximo ao previsto ($51,3 \text{ U g}^{-1}\text{SS}$) pelo modelo.

Dentro do domínio experimental, a variável umidade (UD) exerceu maior influência na produção de lipase. Embora os gráficos de superfície de resposta e de contorno indiquem um aumento de UD além da faixa experimental (tendendo para níveis mais altos) para maximização da atividade de hidrólise, adequou-se esta a um valor central, devido à limitação da técnica, que está diretamente relacionada à quantidade de água livre entre as partículas sólidas (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). A umidade em FES exerce um papel importantíssimo que se estabelece na quantidade de água que, por sua vez, permite uma distribuição mais homogênea dos solutos, gases, nutrientes etc. empregados no cultivo sólido (PANDEY, 2003). Para um teor de umidade elevado, tem-se uma diminuição da porosidade, o que resulta em baixa transferência de oxigênio, podendo provocar aderência da matriz na parede do biorreator, aumentando assim o risco de contaminação e reduzindo as trocas gasosas. Por outro lado, baixos níveis de umidade podem levar a um menor crescimento dos micro-organismos (LONSANE et al., 1985).

Estudando o efeito da umidade no cultivo sólido do bagaço de cana (contendo uma solução nutritiva) pelo gênero *Penicillium*, Teixeira (2015) encontrou em 120 h de

cultivo valor máximo (0,470 UI g⁻¹SS) para produção de lipase em 80% de umidade, o que também está em conformidade com esse trabalho. Pinotti et al. (2017), também, utilizando fungo do gênero *Penicillium*, verificaram que as maiores atividades de lipase estavam relacionadas a maiores umidades no cultivo e, neste caso, apenas a umidade foi considerada como fator significativo na produção de lipase.

Utilizando *Burkholderia cepacia* no cultivo sólido de uma mistura contendo bagaço de cana e farelo de semente de girassol 1:1 (m m⁻¹), Soares et al. (2013) encontraram máxima atividade de hidrólise (91,6 ± 3,3 U g⁻¹SS) em 96 h de cultivo a 75% de umidade. Já Pitol et al. (2017), utilizando uma mistura a 65% de umidade contendo bagaço de cana e farelo de trigo 1:1 (m m⁻¹) em FES pelo fungo *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM, obtiveram em sua condição ótima 262 ± 8 U g⁻¹SS de atividade de lipase. Nesse contexto, uma elevada umidade (60-80%) esteve relacionada à alta atividade enzimática segundo os resultados dos autores mencionados. Baseado na capacidade absorviva de cada tipo de substrato utilizado em FES, segundo Pandey (2003), o teor de umidade pode variar de 18 a 85%, devendo ser considerado valores de umidade inicial mais altos para cultivos mais prolongados, uma vez que a perda de água é inerente ao processo devido ao calor gerado no biorreator pelo metabolismo do micro-organismo.

Em relação à FC&I, o efeito positivo apresentado para esta variável indica que a maximização da resposta é obtida a partir do aumento do nível deste fator. O uso de indutores como fonte de energia e carbono para produção de lipases por micro-organismos tem sido empregado a fim de potencializar o aumento na síntese desta enzima (LIMA et al., 2003; SILVEIRA; TARDIOLI; FARINAS, 2016; SOUZA et al., 2017). A concentração do indutor no cultivo pode variar de um nível mais baixo, o suficiente para promover a secreção de lipase, até um nível onde se alcançará máxima produção enzimática, isso quando não há redução da produção devido a uma quantidade excessiva da fonte de carbono que pode tornar o meio tóxico ao micro-organismo (CIHANGIR; SARIKAYA, 2004; ELIBOL; OZER, 2000).

Romero et al. (2014) avaliaram a produção de lipase em meio fermentativo com e sem indutor (óleo de oliva) pelo fungo *Penicillium corylophilum* e verificaram que as máximas atividades lipolíticas foram obtidas no meio fermentado com indutor, o que representou um aumento de 4 vezes em relação ao meio não induzido. Pinotti et al. (2017), avaliando a influência da produção lipolítica frente à variação da concentração (5, 7,5 e 10%) de óleo de oliva como indutor em FES pelo gênero *Penicillium* e

Rhizomucor, verificaram como condição ótima para ambos os gêneros, que a máxima resposta era promovida a uma concentração de 10% do indutor. Estudando, também, o efeito da concentração de indutor (óleo de soja) para produção de lipase em FES pelo fungo *Rhizopus microsporus*, Botton (2014) constatou que a produção de lipase aumentava significativamente em função do aumento da concentração da fonte de carbono. A autora avaliou o teor de indutor de 1 a 20%, sendo a máxima atividade observada na maior concentração, o que também está em conformidade com os dados obtidos neste trabalho.

No presente estudo, as condições para máxima atividade lipolítica foram observadas em torno de 20-23% da fonte de carbono e indutor, aproximadamente. Nos maiores níveis para esta variável foi possível constatar um decréscimo relativo na síntese de lipase, o que pode estar relacionado ao aumento da concentração de ODF que pode ter provocado uma baixa transferência de oxigênio no meio de cultivo. Níveis mais escassos de oxigênio podem provocar alterações no metabolismo do micro-organismo e, por consequência, diminuir a produção de lipases (Lima et al., 2003).

2.4 CONCLUSÃO

O fungo *P. roqueforti* ATCC 10110 foi capaz de produzir lipases em FES utilizando bagaço de cana, óleo de dendê de fritura e a solução nutriente. Os valores obtidos são bastantes promissores, uma vez que lipases de *P. roqueforti* obtidas por FES têm poucas ocorrências na literatura.

Este é o primeiro relato, utilizando *P. roqueforti* ATCC 10110 para produção de lipase com valores de atividade enzimática consideravelmente elevados ($52,5 \pm 4,9$ U $g^{-1}SS$), o que pode contribuir, de forma mais efetiva, na aplicação do sólido fermentado (SF) em reações de biocatálise.

Neste sentido, a otimização do SF mostrou-se satisfatória com a maximização da atividade de hidrólise em 13% em relação à condição não otimizada.

REFERÊNCIAS

- AIDOO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, B. J. B. Solid substrate fermentations. **Advances in Applied Microbiology**, v. 28, p. 201–237, 1982.
- AMORIM, G. M.; SANTOS, T. C. DOS; PACHECO, C. S. V.; BARRETO, I. M. A.; FREIRE, D. M. G.; FRANCO, M. Fermentation of cocoa meal by *Aspergillus niger* to obtain lipase. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 8, p. 24–27, 2012.
- AYERST, G. The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. **Journal of Stored Products Research**, v. 5, p. 127–141, 1969.
- BOTTON, V. **Síntese de ésteres etílicos catalisada pela adição direta de sólido fermentado de *Rhizopus microsporus* CBPQA 312-07 DRM em sistema livre de solventes**. 2014. 140 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná, 2014.
- CHRISTOPHER, L. P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497–520, 2014.
- 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.
- DURAND, A. Bioreactor design for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 113–125, 2003.
- ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 325–329, 2000.
- FERRAZ, J. L. DE A. A.; SOUZA, L. O.; SOARES, G. A.; COUTINHO, J. P.; OLIVEIRA, J. R. DE; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; FRANCO, M. Enzymatic saccharification of lignocellulosic residues using cellulolytic enzyme extract produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivated on residue of yellow mombin fruit. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 214–220, 2018.
- FERREIRA, A. N.; RIBEIRO, D. D. S.; SANTANA, R. A.; SANTOS FELIX, A. C.; ALVAREZ, L. D. G.; LIMA, E. DE O.; FREITAS, J. S. DE; VALASQUES JUNIOR, G. L.; FRANCO, M.; NASCIMENTO JUNIOR, B. B. DO. Production of lipase from *Penicillium* sp. using waste oils and *Nopalea cochenillifera*. **Chemical Engineering Communications**, v. 204, p. 1167–1173, 2017.
- FREIRE, D. M.; TELES, E. M.; BON, E. P.; SANT'ANNA, G. L. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter: effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 63–65, p. 409–421, 1997.
- GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 85–101, 2003.

GULDHE, A.; SINGH, B.; MUTANDA, T.; PERMAUL, K.; BUX, F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1447–1464, 2015.

LESSA, O. A.; REIS, N. DOS S.; LEITE, S. G. F.; GUTARRA, M. L. E.; SOUZA, A. O.; GUALBERTO, S. A.; OLIVEIRA, J. R. DE; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; FRANCO, M. Effect of the solid state fermentation of cocoa shell on the secondary metabolites, antioxidant activity, and fatty acids. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, p. 107–113, 2017.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M. I. M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, p. 105–110, 2003.

LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 258–265, 1985.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-State Fermentation Bioreactors**. Heidelberg: Springer, 2006.

OKIYAMA, D. C. G.; NAVARRO, S. L. B.; RODRIGUES, C. E. C. Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 63, p. 103–112, 2017.

OLIVEIRA, F.; SOUZA, C. E.; PECLAT, V. R. O. L.; SALGADO, J. M.; RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z.; VENÂNCIO, A.; BELO, I. Optimization of lipase production by *Aspergillus ibericus* from oil cakes and its application in esterification reactions. **Food and Bioproducts Processing**, v. 102, p. 268–277, 2017.

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

PEREIRA FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados**. São Carlos: EdUFSCar, 2017.

PINOTTI, L. M.; LACERDA, J. X.; OLIVEIRA, M. M.; TEIXEIRA, R. D.; RODRIGUES, C.; CASSINI, S. T. A. Production of lipolytic enzymes using agro-industrial residues. **Chemical Engineering Transactions**, v. 56, p. 1897–1902, 2017.

PITOL, L. O.; FINKLER, A. T. J.; DIAS, G. S.; MACHADO, A. S.; ZANIN, G. M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Optimization studies to develop a low-cost medium for production of the lipases of *Rhizopus microsporus* by solid-state fermentation and scale-up of the process to a pilot packed-bed bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 62, p. 37–47, 2017.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 1–15, 1998.

RODRIGUEZ, J. A.; MATEOS, J. C.; NUNGARAY, J.; GONZÁLEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient

source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2264–2269, 2006.

ROMERO, C. M.; BAIGORÍ, M. D.; BARON, A. M.; KRIEGER, N.; PERA, L. M. Activity and stability of lipase preparations from *Penicillium corylophilum*: Potential use in biocatalysis. **Chemical Engineering and Technology**, v. 37, p. 1987–1992, 2014.

SALUM, T. F. C.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; YAMAMOTO, C. I.; CÔCCO, L. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1348–1354, 2010.

SANTOS, T. C. DOS; FILHO, G. A.; BRITO, A. R. DE; PIRES, A. J. V.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp. by solid state fermentation of prickly pear. **Revista Caatinga**, v. 2125, p. 222–233, 2016.

SANTOS, T. C. DOS; GOMES, D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1299–1304, 2012.

SILVA, T. P.; SOUZA, L. O.; SILVA, N. R.; ASSIS, S. A.; FERRERIA, M. L. O.; OLIVEIRA, J. R.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; FRANCO, M. Cultivation of *Penicillium roqueforti* in cocoa shell to produce and characterize its lipase extract. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 16, p. 745–756, 2017.

SILVEIRA, E. A.; TARDIOLI, P. W.; FARINAS, C. S. Valorization of palm oil industrial waste as feedstock for lipase production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, p. 558–571, 2016.

SOARES, D.; PINTO, A. F.; GONÇALVES, A. G.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 15–23, 2013.

SOUZA, C. E. C.; FARIAS, M. A.; RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z. Industrial co-products from canola and soybean oil extraction through lipase production using *Yarrowia lipolytica* in solid-state fermentation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, p. 1163–1176, 2017.

TEIXEIRA, R. D. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido utilizando cepas fúngicas**. 2015. 77 f. Dissertação (Mestrado em Energia) – Universidade Federal do Espírito Santo, 2015.

TISS, A.; CARRIÈRE, F.; VERGER, R. Effects of gum Arabic on lipase interfacial binding and activity. **Analytical Biochemistry**, v. 294, p. 36–43, 2001.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. 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.

CAPÍTULO III

Imobilização de lipase comercial de *Candida rugosa* em Accurel MP 1000

Resumo: Foi investigado no presente estudo a influência de três suportes (Accurel MP 1000, Immobead-150 e Sepabeads FP-BU) na imobilização de lipase de *Candida rugosa* com o propósito de avaliar as diferentes formas de interação entre a enzima e os suportes empregados. A eficiência (E) e retenção da atividade (R) foram avaliados como parâmetros cruciais na verificação do processo. Foram estudadas duas cargas de pó de enzima (10 e 20 mg g⁻¹ de suporte) nas cinéticas de imobilização. Alcançou-se máxima E em todos os suportes estudados, exceto quando se empregou a concentração de enzima de 20 mg g⁻¹ de Accurel MP 1000. A retenção da atividade foi superior quando se empregou a lipase imobilizada em Accurel MP 1000, onde os valores de R foram superiores a 200%. Apesar do suporte Immobead-150 ter apresentado máxima E na imobilização da lipase, os valores de retenção foram inferiores a 60%, o que indica perda significativa da atividade em relação à enzima livre. Por outro lado, a lipase imobilizada em Accurel apresentou E = 98% em 10 mg g⁻¹ do suporte e valor de R = 213%, o que demonstra ativação interfacial da enzima no meio reacional. Nesse sentido, o suporte Accurel MP 1000 apresentou resultados mais eficientes e, por tanto, foi o selecionado para as reações de biocatálise.

Palavras-chave: Imobilização, *Candida rugosa*, Accurel MP 1000.

Immobilization of a commercial lipase from *Candida rugosa* on Accurel MP 1000

Abstract: The influence of three carriers (Accurel MP 1000, Immobead-150 and Sepabeads FP-BU) on lipase immobilization of *Candida rugosa* was investigated in order to evaluate the different forms of interaction between the enzyme and the carriers used. The efficiency (E) and retention of activity (R) were evaluated as crucial parameters in the verification of this process. Two loadings of enzyme powder (10 and 20 mg g⁻¹ carrier) were studied in immobilization kinetics. Maximum E was achieved in all studied carriers except for the concentration of 20 mg g⁻¹ Accurel MP 1000. Activity retention was higher when immobilized lipase on Accurel MP 1000 was used, where the R values were greater than 200%. Although Immobead-150 carrier showed maximum E on lipase immobilization, retention values were lower than 60%, indicating a significant loss of activity relative to the free enzyme. On the other hand, immobilized lipase on Accurel showed E = 98% in 10 mg powder g⁻¹ carrier and R = 213%, which demonstrates interfacial activation of the enzyme in the reaction medium. In this sense, the Accurel MP 1000 carrier presented more efficient results and, therefore, it was selected for the biocatalysis reactions.

Keywords: Immobilization, *Candida rugosa*, Accurel MP 1000.

3.1 INTRODUÇÃO

A utilização de biocatalisadores tem sido vastamente empregado em setores industriais devido a vantagens em relação aos catalisadores químicos, uma vez que enzimas são altamente seletivas, biodegradáveis, catalisam reações sob condições brandas e tem atrelado ao seu uso uma menor quantidade de resíduos gerados ao final da reação. As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são as enzimas que catalisam a hidrólise de gorduras e óleos convertendo-os a ácidos graxos livres, diglicerídeos, monoglicerídeos e glicerol. Ainda são capazes de efetivar reações reversas de síntese, como reações como esterificação e interesterificação. Diante dessa ampla eficiência catalítica a lipase é considerada uma das enzimas com grande potencial biotecnológico (JAEGER *et al.*, 1994).

Lipases não possuem estabilidade desejável na forma solúvel em condições operacionais, podendo assim, perder sua atividade catalítica devido à desnaturação provocada por solventes, por solutos, altas temperaturas ou pela agitação mecânica, além disso, a solubilização da enzima no meio reacional dificulta a sua separação e, assim, sua reutilização. Esses fatos são um grande inconveniente que impede o uso massivo de lipases e enzimas em geral em nível industrial (CAO, 2005; JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

Nesse sentido, é recomendável que a lipase esteja imobilizada, pois a imobilização da enzima pode assegurar vantagens que resultarão na diminuição do custo do processo, principalmente pela possibilidade de reutilização da enzima e pela facilidade de recuperação dos produtos, além de proporcionar mais atividade e estabilidade da enzima (MATEO *et al.*, 2007; VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Nessa perspectiva, o objetivo deste trabalho foi investigar três suportes na imobilização de lipase de *Candida rugosa* (Sigma®) avaliando os parâmetros eficiência do processo e a retenção da atividade. Dentre estes, o suporte que proporcionou melhor eficiência de imobilização e maior atividade em meio orgânico foi escolhido para estudos posteriores de caracterização e verificação de atividade da enzima imobilizada em reações de esterificação do ácido oleico.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Tecnologia Enzimática (LTEB) do departamento de Química da UFPR e no Laboratório de Biotransformação e Biocatálise Orgânica (LaBioCat) do Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas da UESC.

3.2.1 Estudos de imobilização de lipase de *Candida rugosa*

3.2.1.1 Seleção do suporte e cinética de imobilização

Esta etapa do trabalho teve por objetivo avaliar diferentes materiais para a imobilização de lipase de *Candida rugosa* (Sigma®). Foram escolhidos três diferentes suportes com propriedades distintas em relação à forma de interação com a enzima (TABELA 3.1). Para os suportes Accurel MP 1000 e Sepabeads FP-BU, o processo de imobilização ocorre por adsorção física (interações hidrofóbicas) (VILLENEUVE *et al.*, 2000). Quanto ao suporte Immobead-150, a interação se deve a ligação covalente entre grupos funcionais do suporte (epóxi-etano) e da enzima (GUISAN *et al.*, 2001).

Tabela 3.1 – Propriedades dos suportes utilizados na imobilização da lipase de *Candida rugosa*

Suporte	Composição	Características
Accurel MP 1000	Polipropileno	Hidrofóbico Área de superfície ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) 55,985 Tamanho das partículas (μm) < 1500 Porosidade das partículas 0,70
Sepabeads FP-BU	Polimetacrilato	Hidrofóbico Tamanho das partículas (μm) 100 a 500
Immobead-150	Sílica porosa	Polar Grupo funcional – Epóxido <u>Tamanho das partículas (μm) 150 a 300</u>

Fonte: adaptado de Alnoch *et al.*, 2015.

Com o objetivo de acompanhar o processo de imobilização, foi realizada uma cinética para determinar o melhor tempo de contato entre a enzima e os suportes estudados. Para tanto, alíquotas (0,15 mL) foram coletadas do sobrenadante ao longo do tempo (0-48h), sendo a atividade residual mensurada pelo método espectrofotométrico (3.2.2.1). A partir dos resultados experimentais, os valores de

eficiência da imobilização (E) e retenção da atividade (R), foram calculados a partir das Equações 2 e 3, respectivamente (YADAV; JADHAV, 2005).

$$E = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100 \quad (2)$$

$$R = \frac{A_o}{A_t} \times 100 \quad (3)$$

Onde: A_i - atividade inicial total de hidrólise antes da imobilização; A_f - atividade final total de hidrólise no sobrenadante após a imobilização; A_o - atividade observada do imobilizado ($U\ g^{-1}$ do suporte); A_t - atividade teórica do imobilizado ($U\ g^{-1}$ do suporte).

Para o cálculo da eficiência (E), foi considerada a atividade inicial e final do sobrenadante frente à reação de hidrólise em meio aquoso. A retenção da atividade (R) foi determinada pela atividade de hidrólise da enzima imobilizada em meio orgânico (3.2.2.2), comparando-se a atividade teórica, obtida através do balanço de massa expresso em atividade ($U\ g^{-1}$ de suporte), com a diferença de atividade encontrada do sobrenadante no início e no fim do processo de imobilização.

3.2.1.2 Imobilização em Accurel MP 1000 e em Sepabeads FP-BU

A lipase de *C. rugosa* foi imobilizada por adsorção física em Accurel MP 1000 e em Sepabeads FP-BU de acordo com Al-Duri e Yong (2000). Os suportes foram umedecidos com solução (50% em água, v/v) de etanol e acetona para Accurel MP 1000 e Sepabeads FP-BU, respectivamente, por 30 min, posteriormente lavados com água destilada e filtrados. O objetivo deste procedimento foi promover o deslocamento do ar existente no interior do suporte para permitir o acesso de soluções que contêm a enzima. Em seguida, em Erlenmeyer de 25 mL, foram adicionados 0,3 g do suporte e 5 mL da solução enzimática na razão de 10 e 20 mg de pó da enzima por grama de suporte. Esta mistura foi incubada em agitador orbital a 150 rpm a 25 °C por 48 h. Após o processo, o derivado imobilizado foi removido da mistura por filtração em papel de filtro qualitativo, seco em dessecador por 16 h e armazenado a 4 °C.

3.2.1.3 Imobilização em immobead-150

O procedimento para imobilização em Immobead-150 foi realizado de acordo com o método convencional utilizado em suportes com grupos epóxido (KNEZEVIC; MILOSAVIC; BEZBRADICA, 2006). Este método envolve o contato direto entre a enzima e o suporte sem nenhum pré-tratamento. A imobilização ocorre através dos grupos epóxido livres do suporte por ligações covalentes com aminoácidos específicos da enzima.

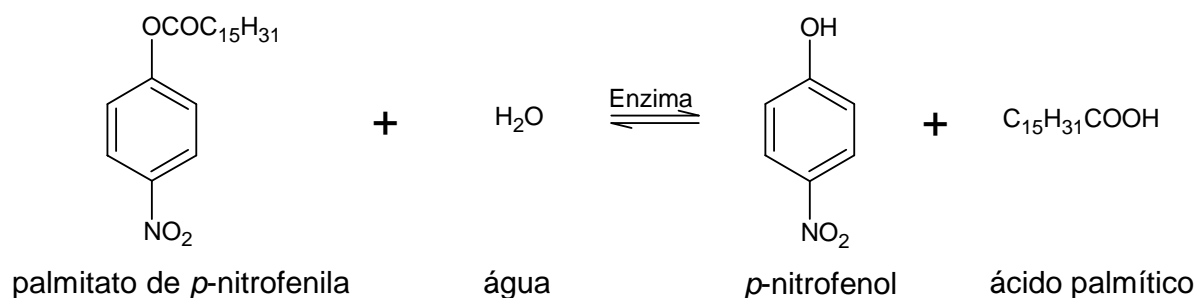
Para tanto, em um Erlenmeyer de 25 mL, foi adicionado 0,3 g do suporte e 10 mL da solução enzimática (razão 10 e 20 mg de pó da enzima g⁻¹ de suporte). Esta mistura foi então incubada em agitador orbital a 150 rpm a 25 °C por 48 h. Após o processo, o derivado imobilizado foi removido da mistura por filtração em papel de filtro qualitativo, seco em dessecador por 16 h e armazenado a 4 °C.

3.2.2 Métodos analíticos

3.2.2.1 Cinética enzimática de hidrólise pelo método *p*-NP (*p*-nitrofenil) em leitor de microplacas

A cinética enzimática foi investigada pela medida da absorbância, a 410 nm, da quantidade de *p*-NP liberado do éster de *p*-nitrofenila (WINKLER; STUCKMANN, 1979), conforme reação ilustrada na Figura 3.1. As reações foram conduzidas durante 5 min à temperatura ambiente (25 °C) em um espectrofotômetro de microplacas iMark™ (Bio-Rad). A atividade foi determinada através da quantificação de *p*-nitrofenol a partir da curva padrão.

Figura 3.1 – Reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP) catalisada por lipases com liberação de *p*-nitrofenol e ácido palmítico



Fonte: (WINKLER; STUCKMANN 1979).

Para os ensaios envolvidos na determinação da atividade foram preparadas duas soluções (A e B), A: Triton X-100 (6%, m v⁻¹) e CaCl₂ (10 mM) em tampão Tris-HCl 500 mM pH 7,0; B: A solução estoque do substrato foi preparada com uma concentração de 20 mM de éster de *p*-nitrofenila (*p*-NP) em acetonitrila/isopropanol (4:1, v v⁻¹). A mistura foi realizada sob agitação e em banho-maria a 60 °C até que a solução se tornasse transparente. A reação foi feita em placas de 96 poços, onde adicionou-se 12,5 µL da solução B, 25 µL da solução A (diluída 10 x), 202,5 µL de água destilada, e 10 µL da solução enzimática, em cada poço. A reação foi iniciada pela adição da enzima e foi monitorada pela variação da absorbância em 410 nm por 5 minutos, realizando medidas a cada 5 s. Um poço para o branco foi conduzido com tampão da amostra no lugar da enzima. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto de reação (µmol min⁻¹) nas condições de ensaio.

3.2.2.2 Atividade de hidrólise em meio orgânico

Para avaliar a atividade de hidrólise em meio orgânico, foi seguido o procedimento proposto por Gonçalves (1999), com algumas modificações. Para o ensaio, foi adicionado 5 mL de meio reacional em frasco hermeticamente fechado de 12 mL contendo 40 mg da enzima imobilizada. O meio reacional consistiu de 4,9 mL de *n*-heptano, 70 mmol L⁻¹ de trioleína e 100 µL (2% v/v) de água destilada. Nos ensaios em que se utilizou a enzima em sua forma livre em tampão, foram adicionados ao meio reacional 100 µL da solução contendo a enzima (1,5 mg de pó por mL).

A reação foi realizada sob agitação de 180 rpm, a 40 °C e, em intervalos fixos, alíquotas de 100 µL foram coletadas do meio reacional e analisadas quanto ao teor de ácido graxo residual através método de Lowry-Tinsley (ITEM 3.2.2.2.1). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de promover a produção de 1 µmol de ácidos graxos por min nas condições do ensaio.

3.2.2.2.1 Método de Lowry-Tinsley

O método de Lowry-Tinsley (1976) foi utilizado para quantificar o teor de ácido oleico durante a reação de hidrólise da trioleína em meio orgânico. O ensaio foi realizado em microtubos (Eppendorf – 2,0 mL) contendo 1,15 mL de tolueno e 250 µL

do reativo de cor, que consiste em uma solução aquosa de acetato de cobre II (5%), com pH (6,0-6,2) corrigido previamente com piridina. Adicionaram-se 100 μ L da amostra e a mistura foi agitada em vórtex durante 40 segundos e a absorbância da fase orgânica medida em espectrofotômetro a 715 nm.

A concentração de ácido graxo no meio é relacionada à absorbância pela curva de calibração feita com o ácido oleico (Sigma, pureza 90%), que foi obtida nas mesmas condições do ensaio. Nas reações de hidrólise, a atividade foi calculada a partir da liberação dos ácidos graxos no meio reacional e uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de promover a produção de 1 μ mol de ácidos graxos por min nas condições do ensaio.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Cinética de imobilização e seleção do suporte

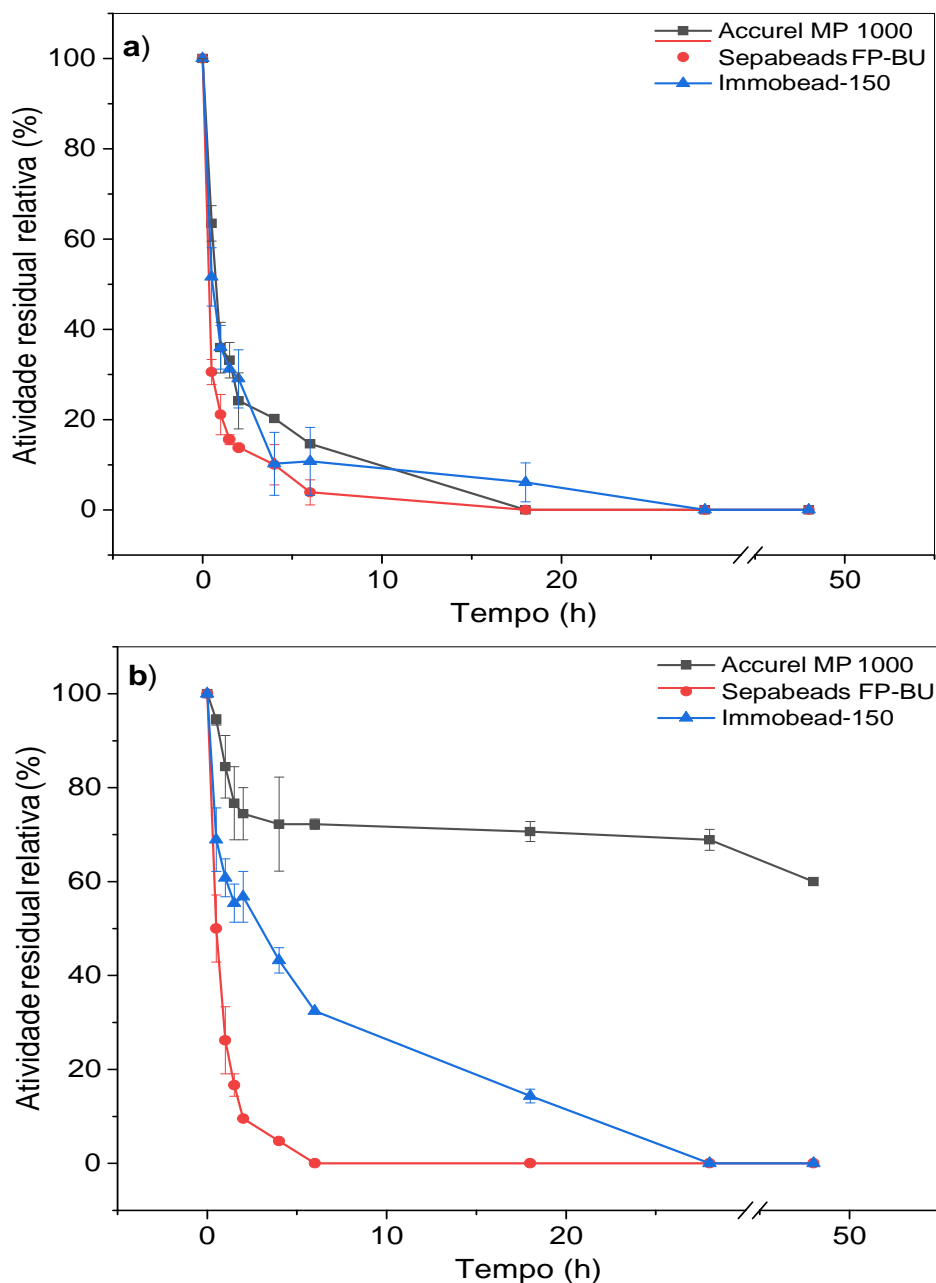
Através da cinética de imobilização (FIGURA 3.2) que, também, foi utilizada para avaliar a eficiência de cada suporte frente à carga de enzima utilizada durante o processo, foi possível verificar qual suporte se adequava de forma mais satisfatória às reações em meio orgânico.

A cinética de imobilização foi acompanhada a fim de avaliar a efetividade do processo de imobilização em relação à atividade residual do sobrenadante da solução contendo a enzima. Após ensaios preliminares (dados não mostrados), fixou-se a razão de pó de enzima/grama de suporte, uma vez que valores na determinação de proteína total foram bastantes baixos, o que inviabilizava o acompanhamento da cinética tendo como base a concentração em mg de proteína.

Partindo-se do pressuposto de que eficiência de imobilização é calculada a partir do desaparecimento da atividade presente do sobrenadante, em relação ao tempo, obteve-se a melhor eficiência, em ambas as cinéticas (FIGURA 3.2), para Immobead-150 com $E = 100\%$ com pouco mais de 6 h. Já para Sepabeads FP-BU, $E = 100\%$ foi alcançado após 24 h nas duas cargas estudadas. Para Accurel, foram alcançados $E = 98\%$ e $E = 39\%$, para 10 e 20 mg g^{-1} de suporte nas cinéticas realizadas em cerca de 20 e 48 h, respectivamente (TABELA 3.2). De maneira semelhante, Alnoch et al. (2015) e Madalozzo et al. (2015) encontraram valores de eficiência mais altos, para Accurel e Immobead-150, nas menores razões de proteína/grama de

suporte oferecidas na imobilização, o que neste caso pode estar associado à saturação do suporte em cargas mais elevadas de proteína.

Figura 3.2 – Cinética de imobilização da lipase de *Candida rugosa* em termos de atividade residual do sobrenadante



Imobilização com **(a)** 10 e **(b)** 20 mg g⁻¹ de suporte;

A atividade residual do sobrenadante foi determinada pelo método espectrofotométrico utilizando o palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP) como substrato. Os valores apresentados são a média da triplicata dos ensaios \pm o erro padrão da média (EPM). Nos casos em que a barra do EPM não aparece, significa que esta é menor que símbolo que a representa.

A porosidade das partículas dos suportes influencia de forma bastante significativa no que se relaciona a efetividade da imobilização. Segundo Soares (2000)

e Soares et al. (1999), a morfologia do suporte empregado deve ser adequada o suficiente para acomodar a enzima de maneira que haja disponibilidade de acesso ao substrato pela enzima.

Em todos os ensaios envolvidos nas cinéticas de imobilização, pôde-se observar alta eficiência do processo, exceto para a cinética conduzida em Accurel para a carga de 20 mg g⁻¹ de suporte, onde houve uma redução significativa na eficiência do processo (TABELA 3.2). No entanto, uma alta eficiência de imobilização não é garantia de que a enzima esteja ativa no suporte, pois este parâmetro avalia somente o desaparecimento de atividade do sobrenadante.

Tabela 3.2 – Principais parâmetros avaliados na imobilização de lipase de *Candida rugosa* nos diferentes suportes

Suporte		E (%)	Atividade teórica U g ⁻¹ de suporte	Atividade Real U g ⁻¹ de suporte em meio orgânico	R (%)
Accurel MP 1000	A	98	10,00	22,13 ± 0,56	213
	B	39	2,30	7,17 ± 0,20	316
Immobead-150	A	100	11,10	5,68 ± 1,21	54
	B	100	4,10	2,26 ± 0,50	56
Sepabeads FP-BU	A	100	11,00	18,76 ± 0,45	172
	B	100	4,60	6,38 ± 0,13	139

Fonte: os valores para cada parâmetro analisado foram obtidos conforme descrito por Alnoch et al. (2015).

A: 10 mg g⁻¹ de suporte;

B: 20 mg g⁻¹ de suporte;

Eficiência (%) – E (%): calculada por diferença entre a atividade inicial de lipase de *C. rugosa* e a atividade final no sobrenadante após a imobilização;

A atividade de hidrólise em meio orgânico foi realizada em n-heptano, a 40 °C, 180 rpm, utilizando trioleína (70 mmol L⁻¹) como substrato;

Retenção de atividade – R (%): calculada comparando-se a atividade adsorvida teórica, obtida através do balanço de massa expresso em atividade (expressa em U g⁻¹ de suporte) e a atividade real da enzima imobilizada em meio orgânico.

Nesse aspecto, foram realizados ensaios em meio orgânico para verificar se a enzima permanecia ativa nos suportes empregados e avaliar a retenção em relação à atividade da enzima livre. A atividade teórica da lipase foi calculada a partir da atividade da enzima livre no meio orgânico e do balanço de massa de atividade do sobrenadante no início e fim do processo de imobilização, considerando-se a atividade adsorvida no suporte, dividindo-se pela massa de suporte (g) oferecida para a imobilização. A determinação da atividade foi realizada em meio orgânico (*n*-heptano) para evitar a dessorção da enzima do suporte.

A partir de análise prévia da Tabela 3.2, foi possível constatar que a enzima imobilizada em Accurel e Sepabeads FP-BU apresentou os maiores valores de atividade em meio orgânico, o que sugere uma ativação da enzima após a imobilização, o que é, também, reforçado pelos altos valores de retenção (R). Uma possível explicação para esse fenômeno pode estar no fato de que a lipase está adsorvida e estabilizada em sua conformação estrutural aberta, pois a *lid* possui resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e, nesse sentido, a lipase estaria se ligando ao suporte e sofrendo ativação interfacial concomitantemente, o que acarreta na exposição mais acentuada do sítio ativo da enzima no meio reacional facilitando o acesso ao substrato (BRADY *et al.*, 1990).

A hidrofobicidade característica do suporte pode ter promovido esse tipo de ativação. Muitos autores têm relatado os suportes hidrofóbicos como ideais para imobilização de lipases (MANOEL *et al.*, 2015; TECELÃO *et al.*, 2012), uma vez que seu caráter hidrofóbico contribui de forma significativa no processo, acentuando o contato com as regiões próximas ao sítio ativo e, também, o fato deste tipo de imobilização ser menos agressiva a estrutura conformacional da enzima (MATEO *et al.*, 2007).

Alnoch *et al.* (2015) e Madalozzo *et al.* (2015) utilizando Accurel MP 1000 na imobilização de LipC6G9 e LipC12, respectivamente, constataram valores de R acima de 100%, o que também está em conformidade com os resultados encontrados neste trabalho. Resultados inferiores foram encontrados por Knezevic *et al.* (2002) na imobilização de lipase de *Candida rugosa* em diferentes concentrações de alginato, onde a máxima retenção alcançada foi de 74,99%. Utilizando suportes acrílicos hidrofóbicos na imobilização de lipase de *Candida rugosa*, Bryjak e Trochimczuk (2006) obtiverem rendimento máximo de 25,4%, o que é bastante inferior aos resultados encontrados neste trabalho.

Em relação ao suporte Immobead-150, foram observados valores muito baixos de atividade da enzima comparado aos outros suportes, mesmo tendo apresentado eficiência de 100% nas duas concentrações estudadas. Uma possível explicação para este fenômeno pode estar no fato de que durante as reações em meio orgânico foi observada a formação de agregados insolúveis, o que diminuía de forma significativa o contato do derivado imobilizado com o meio reacional (KLIBANOV, 2001; ZAKS; KLIBANOV, 1988), o que também foi relatado por Alnoch *et al.* (2015).

Utilizando Immobead-150 para imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* em diferentes cargas de proteína (5, 10 e 20 mg g⁻¹ de suporte), Matte et al. (2014) obtiveram valores entre 91-100% de eficiência, porém valores de recuperação entre 20-95%, o que demonstra que não houve ativação interfacial após a imobilização, fato este também observado no presente estudo.

Analisando a atividade da lipase de *C. rugosa* nos suportes estudados, Immobead-150 e Sepabeads FP-BU apresentaram máxima eficiência nas duas cargas estudadas. Entretanto, o suporte Accurel MP 1000 apresentou maior retenção de atividade nas duas cinéticas, porém, maior eficiência e atividade em meio orgânico para a menor concentração estudada (TABELA 3.2). Nessa perspectiva, os ensaios posteriores foram conduzidos na menor carga estudada no suporte Accurel MP 1000.

3.4 CONCLUSÃO

Neste estudo preliminar, a lipase de *Candida rugosa* foi avaliada em relação às diferentes formas de imobilização com os suportes empregados. Nesse aspecto, o melhor suporte para imobilização foi Accurel MP 1000, o que pôde ser constatado devido a maiores valores de retenção e atividade de lipase em meio orgânico. Os altos valores de retenção apresentados neste estudo demonstram a eficácia do processo, por meio do qual foi possível constatar/inferir a ativação interfacial da lipase em meio orgânico.

REFERÊNCIAS

- AL-DURI, B.; YONG, Y. P. Lipase immobilisation : an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 207–215, 2000.
- ALNOCH, R. C.; MARTINI, V. P.; GLOGAUER, A.; COSTA, A. C. D. S.; PIOVAN, L.; MULLER-SANTOS, M.; SOUZA, E. M. DE; PEDROSA, F. D. O.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Immobilization and characterization of a new regioselective and enantioselective lipase obtained from a metagenomic library. **Plos One**, v. 10, p. 1–12, 2015.
- BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J. P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; MENGE, L. T. & U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 3, p. 767–770, 1990.
- BRYJAK, J.; TROCHIMCZUK, A. W. Immobilization of lipase and penicillin acylase on hydrophobic acrylic carriers. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 573–578, 2006.
- CAO, L. Immobilised enzymes: Science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 217–226, 2005.
- GONÇALVES, A. P. V. **Imobilização de uma cutinase recombinada no zeólito NaY: estudos cinéticos e de estabilidade**. 1999. 246 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Técnica de Lisboa, 1999.
- GUISAN, J. M.; SABUQUILLO, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FERNANDEZ-LORENTE, G. Preparation of new lipases derivatives with high activity – stability in anhydrous media : adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylenimine. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 817–824, 2001.
- JAEGER, K.-E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; HEUVEL, M. VAN; ET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 29–63, 1994.
- JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: A review. **Adsorption**, v. 20, p. 801–821, 2014.
- KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature**, v. 409, p. 241–246, 2001.
- KNEZEVIC, Z.; BOBIC, S.; MILUTINOVIC, A.; OBRADOVIC, B.; MOJOVIC, L.; BUGARSKI, B. Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 313–318, 2002.
- KNEZEVIC, Z.; MILOSAVIC, N.; BEZBRADICA, D. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, p. 269–278, 2006.

LOWRY, R. R.; TINSLEY, I. J. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 53, p. 470–472, 1976.

MADALOZZO, A. D.; MARTINI, V. P.; KUNIYOSHI, K. K.; SOUZA, E. M. DE; PEDROSA, F. O.; GLOGAUER, A.; ZANIN, G. M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Immobilization of LipC12, a new lipase obtained by metagenomics, and its application in the synthesis of biodiesel esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 116, p. 45–51, 2015.

MANOEL, E. A. *et al.* Accurel MP 1000 as a support for the immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia*: Application to the kinetic resolution of myo-inositol derivatives. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1557–1564, 2015.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451–1463, 2007.

MATTE, C. R.; BUSSAMARA, R.; DUPONT, J.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by different techniques on Immobead 150 support: Characterization and applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 2507–2520, 2014.

SOARES, C. M. F. **Otimização por planejamento experimental da imobilização de lipase em sílica de porosidade controlada na presença de estabilizantes**. 2000. 170 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, 2000.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F. DE; MORAES, F. F. DE; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77, p. 77–79, 1999.

TECELÃO, C.; GUILLÉN, M.; VALERO, F.; FERREIRA-DIAS, S. Immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase: A feasible biocatalyst for the production of human milk fat substitutes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 67, p. 104–110, 2012.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. 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*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, p. 663–670, 1979.

YADAV, G. D.; JADHAV, S. R. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 86, p. 215–222, 2005.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 3194–3201, 1988.

CAPÍTULO IV

Caracterização e aplicação na síntese de ésteres do sólido fermentado por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 comparada à uma lipase comercial de *Candida rugosa* imobilizada em Accurel MP 1000

Resumo: Ésteres que compõem o biodiesel são sintetizados, geralmente, por transesterificação alcalina em processos industriais utilizando-se de óleos vegetais (triacilgliceróis) e álcoois de cadeia curta. Devido às impurezas e aos elevados teores de resíduos gerados ao fim da reação, novas rotas para síntese de ésteres têm sido empregadas como a utilização de enzimas, as quais podem catalisar reações de esterificação e transesterificação. Neste trabalho, avaliou-se o estudo de caracterização em meio orgânico (em diferentes solventes e temperaturas) do sólido fermentado por *Penicillium roqueforti* (SFPR) comparado à lipase de *Candida rugosa* imobilizada em Accurel MP 1000 (LCRI) e ao final foram aplicados em reações de esterificação. Foi observada elevada estabilidade da LCRI e do SFPR quando incubados em solventes orgânicos por 5 h a 30 °C. A atividade residual contra a trioleína para a LCRI e o SFPR se mantiveram, respectivamente, em cerca de $97,3 \pm 1,8$ e $94,2 \pm 2,2\%$ em *n*-heptano (log P 4,0) e $95,6 \pm 0,4$ e $87,8 \pm 1,2\%$ para *n*-hexano (log P 3,5). Para acetona (log P -0,23), EtOH (log P -0,31) e MeOH (log P -0,76) o sólido fermentado (SF) apresentou maior estabilidade em relação à LCRI. Ambos os preparados mantiveram suas atividades em pouco mais de 90% quando incubados em *n*-heptano a 30 °C e mais de 40% para LCRI quando incubada à 40 e 50 °C, ao passo que para o SFPR ficando acima de 60% nessas mesmas condições. A atividade de esterificação (AE) foi avaliada frente ao consumo de ácido oleico do meio reacional. As respectivas AE's para a LCRI e o SFPR foram $8,2 \pm 0,0$ e $3,4 \pm 0,1$ U g⁻¹SS e conversão em éster de $47,6 \pm 0,2$ e $36,4 \pm 0,1\%$ em 96 h. O reuso de ambos os preparados também foi investigado em cinco ciclos sucessivos de síntese, sendo observada conversões relativas para a LCRI em torno de 85% até o último ciclo e de, aproximadamente, 60% para SFPR no 5º ciclo. Esses resultados são promissores e destacam o emprego do SF por *P. roqueforti* ATCC 10110 contendo lipase pela primeira vez em reações de biocatálise.

Palavras-chave: Biodiesel, Lipase, Esterificação, Sólido fermentado, *Penicillium roqueforti*, *Candida rugosa*.

Characterization and application in ester synthesis of the fermented solid by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 compared to the commercial lipase from *Candida rugosa* immobilized on Accurel MP 1000

Abstract: Esters that make up biodiesel are generally synthesized by alkaline transesterification in industrial processes using vegetable oils (triacylglycerols) and short chain alcohols. Due to impurities and high residue levels generated at the end of the reaction, new routes for ester synthesis have been employed as the use of enzymes, which can catalyze reactions of esterification and transesterification. In this work, the characterization study in organic medium (in different solvents and temperatures) of the fermented solid by *Penicillium roqueforti* (SFPR) compared to the lipase from *Candida rugosa* immobilized on Accurel MP 1000 (LCRI) were evaluated and finally applied in esterification reactions. High stability of LCRI and SFPR was observed when incubated in organic solvents for 5 h at 30 °C. The residual activity, with triolein as substrate, for LCRI and SFPR remained about, respectively, 97.3 ± 1.8 and $94.2 \pm 2.2\%$ in n-heptane (log P 4.0) and 95.6 ± 0.4 and $87.8 \pm 1.2\%$ for n-hexane (log P 3.5). For acetone (log P -0.23), EtOH (log P -0.31) and MeOH (log P -0.76) the fermented solid (SF) presented greater stability with respect to LCRI. Both enzymatic preparations maintained their activities at slightly over 90% when incubated in n-heptane at 30 °C and more than 40% for LCRI when incubated at 40 and 50 °C, whereas for SFPR being above 60% in these conditions. The esterification activity (AE) was evaluated with consumption oleic acid of the reaction medium. The respective AE's for LCRI and SFPR were 8.2 ± 0.0 and 3.4 ± 0.1 Ug-1SS and ester conversion of 47.6 ± 0.2 and $36.4 \pm 0.1\%$ in 96 h. The reuse of both preparations was also investigated in five successive cycles of synthesis, with relative conversions for the LCRI being observed around 85% until the last cycle and about 60% for SFPR in the 5th cycle. These results are promising and highlight the use of SF by *P. roqueforti* ATCC 10110 containing lipase for the first time in biocatalysis reactions.

Keywords: Biodiesel, Lipase, Esterification, Fermented solid, *Penicillium roqueforti*, *Candida rugosa*.

4.1 INTRODUÇÃO

O biodiesel é uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos carboxílicos de cadeia longa que pode ser produzido pela transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais, ou pela esterificação de ácidos graxos livres, mediante a utilização de catalisadores químicos ou enzimáticos, que podem ser homogêneos ou heterogêneos. Para este processo é necessário usar triacilgliceróis com baixos níveis de umidade ($< 0,5\%$) e de ácidos graxos livres ($< 1\%$), o que limita o uso de matérias-primas de baixo custo. Como uma alternativa para a via química, nos últimos anos, o processo de síntese enzimática, que utiliza lipases, vem ganhando importância especial na produção de biodiesel, pois pode partir de matérias-primas residuais que contenham elevados teores de ácidos graxos e água (FERNANDES et al., 2007; SALUM et al., 2010).

Certas lipases (triacilglicerol hidrolases EC 3.1.1.3) apresentam altos níveis de atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos, assim como na síntese do biodiesel, o que facilita a sua aplicação em reações como a esterificação e a transesterificação. No entanto, o alto custo das enzimas comerciais dificulta a utilização das lipases nesses processos. Uma alternativa é o uso de sólidos fermentados com atividade lipolítica que têm potencial para reduzir os custos na síntese enzimática de biodiesel (ZAGO et al., 2014). Os melhores resultados até o momento foram obtidos utilizando sólidos fermentados produzidos com a bactéria *Burkholderia contaminans* LTEB11 em uma mistura de bagaço de cana e farinha de semente de girassol. Com este sólido, foi obtida uma conversão de 95% em 46 h para transesterificação de óleo de soja com etanol (SALUM et al., 2010) e uma conversão de 88% em 24 h para a esterificação etílica dos ácidos graxos da borra de soja (DIAS et al., 2017).

Neste âmbito, objetivou-se neste trabalho o emprego do sólido fermentado por *P. roqueforti* ATCC 10110 (SFPR) contendo atividade lipolítica e da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em Accurel MP 1000 (LCRI) na síntese de ésteres etílicos. Este estudo comparativo pode contribuir para desenvolvimento da biotecnologia, uma vez que a lipase de *P. roqueforti* não possui muitas ocorrências na literatura, contudo apresenta potencial na produção de diversos metabólitos (FERRAZ et al., 2018; LESSA et al., 2017; SILVA et al., 2017), o que corrobora o estudo de aplicação dessa lipase fúngica.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Tecnologia Enzimática (LTEB) do departamento de Química da UFPR e no Laboratório de Biotransformação e Biocatálise Orgânica (LaBioCat) do Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas da UESC.

4.2.1 Caracterização em meio orgânico

Para efeito de comparação, todos os ensaios envolvidos neste capítulo foram realizados com o SFPR contendo atividade lipolítica nas condições otimizadas no Capítulo II e a LCRI conforme descrito no Capítulo III.

4.2.1.1 Estabilidade em solventes orgânicos

Esta etapa do trabalho foi adaptada do método descrito por Alnoch et al., (2015) e teve como finalidade avaliar a estabilidade da LCRI e do SFPR em solventes orgânicos com diferentes log P. Para tanto, incubaram-se 50 mg (LCRI) e 350 mg (SFPR), respectivamente, em 1 e 8 mL de solvente por 5 h em banho termostaticado a 30 °C. Após a incubação, o material foi então removido da mistura por filtração a vácuo em papel de filtro qualitativo e seco em dessecador por 16 h, a 4 °C. A atividade residual da LCRI e do SFPR foi avaliada pela hidrólise em meio orgânico (4.2.2.1). Os solventes orgânicos utilizados foram *n*-heptano (log P 4,0), *n*-hexano (log P 3,5), acetona (log P -0,23), etanol (EtOH) (log P -0,31) e metanol (MeOH) (log P -0,76).

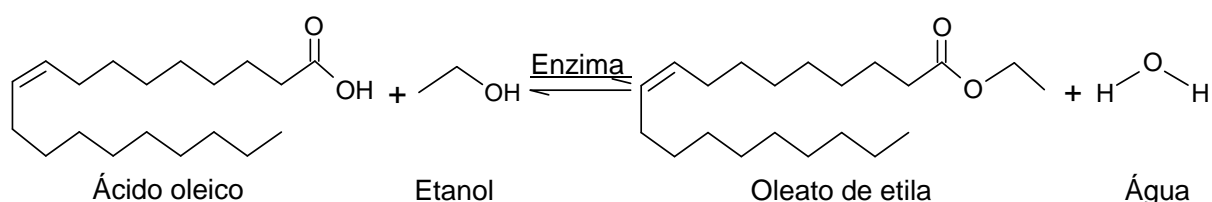
4.2.1.2 Estabilidade à temperatura

A termoestabilidade da LCRI e do SFPR, método também adaptado de Alnoch et al., (2015), foi avaliada pela incubação em banho termostaticado por 5 h em diferentes temperaturas (de 30 a 60 °C). Foram incubados 50 mg (LCRI) e 350 mg (SFPR), respectivamente, em 1 e 8 mL de *n*-heptano para evitar a dessorção da enzima. Após a incubação, foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 4.2.1.1 para secagem dos derivados. A atividade residual da LCRI e do SFPR foi avaliada pela hidrólise em meio orgânico (4.2.2.1).

4.2.1.3 Atividade de esterificação

O desempenho (atividade e conversão em éster) da LCRI e do SFPR na síntese de ésteres foi avaliado utilizando como reação padrão a síntese do oleato de etila (FIGURA 4.1). As reações foram realizadas em agitador orbital em frasco hermeticamente fechado de 12 mL. Para os ensaios com a LCRI e o SFPR foram utilizados 100 e 500 mg (6,5 e 5 unidades de atividade de hidrólise em meio orgânico contra trioleína – U), respectivamente, em 5 e 10 mL de meio reacional composto de 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico e 210 mmol L⁻¹ de etanol em *n*-heptano, 40 °C, 200 rpm (FERNANDES et al., 2007).

Figura 4.1 – Reação de esterificação do ácido oleico catalisada por lipases com liberação do oleato de etila e água



Fonte: adaptado de Soares et al. (2013)

A conversão em éster (%) foi calculada através do consumo de ácidos graxos do meio reacional em relação à concentração inicial do ácido (A_i), considerando que a síntese do éster é inversamente proporcional ao desaparecimento do ácido graxo do meio reacional, através da Equação 4:

$$CC_{EE} = 100 \left(1 - \frac{n_{ff}}{n_{ii}} \right) \quad (4)$$

Sendo:

C_E: conversão em éster (%)

n_f: número de mols de ácido oleico no tempo final (A_f)

n_i: número de mols de ácido oleico no tempo zero (A_i)

Em intervalos fixos, alíquotas de 100 µL foram coletadas do meio reacional e analisadas quanto ao teor de ácido graxo residual, através método de Lowry-Tinsley, (1976) (3.2.2.2.1). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para consumir 1 µmol min⁻¹ de ácido graxo nas condições do ensaio. Foram realizados também controles com a adição dos suportes

sem a lipase; já para os ensaios-controle com o SFPR não houve adição de ácido oleico.

4.2.1.4 Reuso da LCRI e do SFPR na síntese de ésteres em *n*-heptano

O estudo de reutilização em 5 ciclos de reação de esterificação foi realizado com os preparados de LCRI e SFPR. Foi utilizado procedimento padrão de síntese do oleato de etila em *n*-heptano (4.2.1.3). O tempo de reação em cada ciclo foi de 96 h para a LCRI e o SFPR. Após cada ciclo, os preparados foram lavados com 2 volumes de 5 mL e 10 mL de *n*-hexano para a LCRI e o SFPR, respectivamente, durante a filtração a vácuo que foram recuperados e secos em dessecador a vácuo por 16 h a 4 °C. Após este período, os preparados foram submetidos a um novo ciclo de reação, no qual a massa final de cada preparado era aferida, uma vez que perdas eram inerentes ao processo de recuperação. As conversões foram analisadas pelo método de Lowry-Tinsley (3.2.2.2.1) após cada ciclo de reutilização e expressas em percentual da conversão absoluta obtida em cada ciclo.

4.2.2 Métodos analíticos

4.2.2.1 Atividade de hidrólise em meio orgânico

Para avaliar a atividade de hidrólise em meio orgânico, foi seguido o procedimento proposto por Gonçalves (1999), com algumas modificações. Para os ensaios com a LCRI e o SFPR foram utilizados 40 e 300 mg, respectivamente, em 5 e 10 mL de meio reacional em frasco hermeticamente fechado de 12 mL. O meio reacional consistiu de 4,9 mL de *n*-heptano, 70 mmol L⁻¹ de trioleína e 100 µL (2% v/v) de água destilada.

A reação foi realizada sob agitação de 180 rpm, a 40 °C e, em intervalos fixos, alíquotas de 100 µL foram coletadas do meio reacional e analisadas quanto ao teor de ácido graxo residual através método de Lowry-Tinsley (3.2.2.2.1). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol min⁻¹ de ácido graxo nas condições do ensaio.

4.2.2.2 Método de Lowry-Tinsley

O método de Lowry-Tinsley (1976) foi utilizado para quantificar o teor de ácido oleico durante a reação de hidrólise da trioleína em meio orgânico. O ensaio foi realizado em microtubo (Eppendorf – 2,0 mL) contendo 1,15 mL de tolueno e 250 μ L do reativo de cor, que consiste em uma solução aquosa de acetato de cobre II (5%), com pH (6,0-6,2) corrigido previamente com piridina. Adicionaram-se 100 μ L da amostra e a mistura foi agitada em vórtex durante 40 segundos e a absorbância da fase orgânica medida em espectrofotômetro a 715 nm.

A concentração de ácido graxo no meio é relacionada à absorbância pela curva de calibração feita com o ácido oleico (Sigma, pureza 90%), que foi obtida nas mesmas condições do ensaio. Nas reações de hidrólise, a atividade foi calculada a partir da liberação dos ácidos graxos no meio reacional e uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz liberar 1 μ mol min^{-1} de ácido graxo nas condições do ensaio.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Caracterização em meio orgânico

4.3.1.1 Estabilidade em solventes orgânicos

O uso de biocatalisadores em reações em meio de solvente reforça o estudo de estabilidade enzimática nestes compostos, uma vez que o tipo de solvente empregado pode contribuir de maneira efetiva na catálise enzimática (SOARES et al., 2013). Nesse âmbito, os compostos empregados neste estudo se destacam pela sua ampla aplicabilidade nas reações envolvendo o uso de lipases quando estes são utilizados como meio reacional (*n*-heptano, *n*-hexano etc.) ou substrato da reação (etanol, metanol etc.) (WANG et al., 2016).

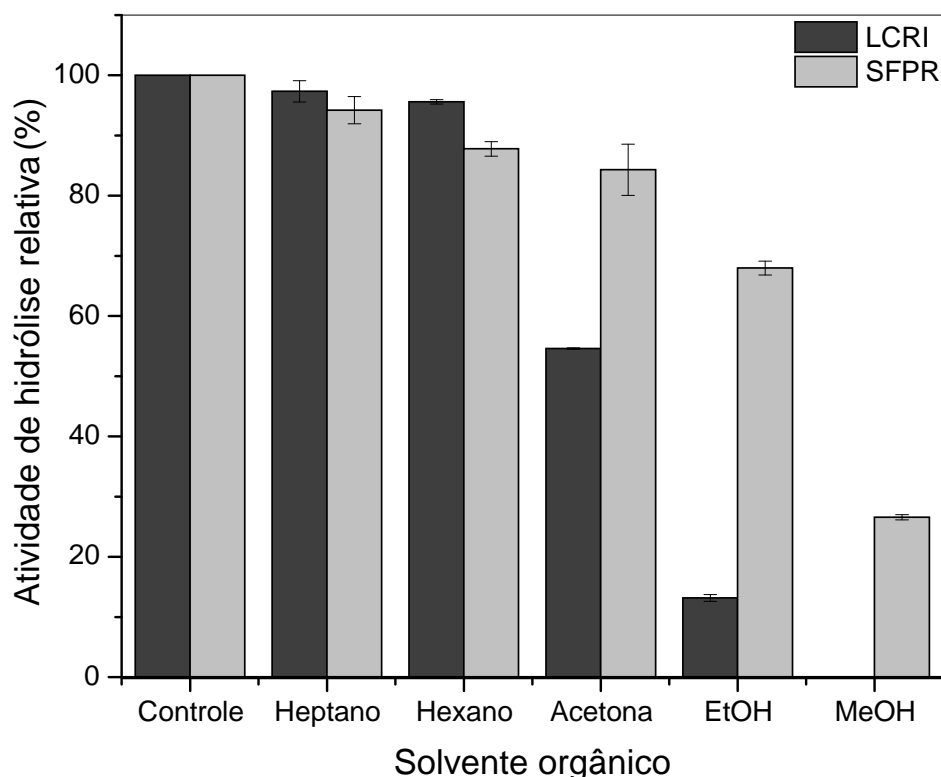
A natureza do solvente utilizado pode afetar diretamente a estabilidade da enzima. Quando se faz referência a compostos hidrofóbicos sendo utilizados como meio de reação, estes tendem a acentuar ou manter a estabilidade da enzima, pois a interação destes com a água de hidratação, a qual confere ativação ao biocatalisador, é menos pronunciada. Quando se trata de compostos menores e mais polares como

o metanol e etanol, comumente empregados como substratos nestes tipos de reação, a estabilidade é afetada de maneira a diminuir o potencial catalítico da enzima, pois devido à hidrofiliabilidade mais acentuada destes compostos, a água de hidratação é retirada de forma mais pronunciada (NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005; YANG et al., 2012).

Conforme resultados apresentados na Figura 4.2, foi possível constatar uma elevada estabilidade para ambos os preparados na maioria dos solventes empregados neste estudado. A medida que se aumentava o grau de hidrofiliabilidade do solvente, a estabilidade caía no período de incubação – 5 h a 30 °C. As atividades residuais para a LCRI e o SFPR se mantiveram, respectivamente, em cerca de $97,3 \pm 1,8$ e $94,2 \pm 2,2\%$ para *n*-heptano e $95,6 \pm 0,4$ e $87,8 \pm 1,2\%$ para *n*-hexano. Um decréscimo mais acentuado foi observado para LCRI em acetona, EtOH e MeOH com uma atividade residual de $54,6 \pm 0,1$, $13,0 \pm 0,6$ e 0% , respectivamente. Ao passo que o SFPR demonstrou mais resistência, sendo observada uma atividade relativa de $84,0 \pm 4,2$, $68,0 \pm 1,1$ e $26,6 \pm 0,4\%$ para acetona, EtOH e MeOH, respectivamente. Uma possível explicação para a maior resistência do SFPR em relação à LCRI nestes solventes mais polares, pode estar no fato de que o primeiro trata-se de um sólido bruto (multienzimático), que neste caso pode ter promovido uma proteção às lipases por parte das outras proteínas/moléculas que compõem o sólido e, por consequência, podem ter minimizado o efeito de retirada da água de hidratação necessária para manutenção da atividade catalítica, fato este não observado para a LCRI, possivelmente por se tratar de uma enzima purificada (FERRAZ et al., 2018).

Madalozzo et al., (2013) utilizando LipC12 imobilizada em Immobead-150 relataram uma atividade residual após 12 h de incubação, 40°C e sob agitação de 250 rpm em *n*-heptano e *n*-hexano de 93 ± 3 e $89 \pm 0\%$, respectivamente. Sob essas mesmas condições, os referidos autores demonstraram uma atividade relativa para EtOH de $62 \pm 2\%$ e MeOH de $3 \pm 0\%$, tendência esta também observada neste estudo. Comportamento semelhante também foi relatado por Alnoch et al., (2015) no emprego de LipC6G9 imobilizada em Accurel MP 1000 no estudo de estabilidade em solventes orgânicos por 8 h a 30 °C, sendo observada uma atividade residual de $89 \pm 5\%$ para *n*-heptano e $79 \pm 4\%$ em *n*-hexano. Os autores ainda relataram uma perda de atividade de cerca de 70% quando incubaram LipC6G9 imobilizada em MeOH, o que também se assemelha aos resultados encontrados neste estudo.

Figura 4.2 – Estabilidade da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em Accurel MP 1000 e do sólido fermentado de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 em diferentes solventes



Condições: para as amostras controle, não houve pré-incubação. A LCRI e o SFPR foram incubados, respectivamente, em 1 e 8 mL de solvente por 5 h a 30 °C.

A atividade residual, para a LCRI e o SFPR, foi avaliada pela hidrólise da trioleína em meio orgânico a 40 °C e 180 rpm utilizando 40 e 350 mg da LCRI e do SFPR, respectivamente. O teor de ácidos graxos livres foi analisado pelo método de Lowry-Tinsley. Os valores apresentados são a média da triplicata dos ensaios \pm o erro padrão da média (EPM). Nos casos em que a barra do EPM não aparece, significa que esta é menor que o símbolo que a representa

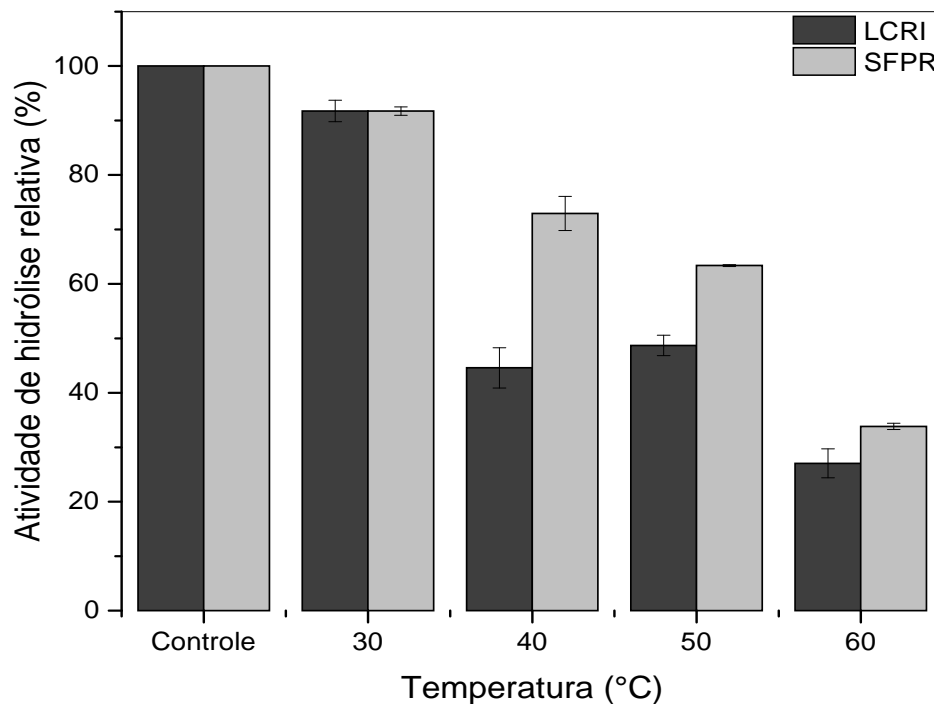
Silva et al. (2017) avaliando o efeito da adição de solventes no meio reacional de hidrólise do *p*-nitrofenol palmitato na atividade de lipase no extrato multienzimático obtido a partir da fermentação no estado sólido (FES) do farelo de cacau por *P. roqueforti* ATCC 10110, relataram uma atividade residual para acetona e MeOH de 51,31 e 32,26%, respectivamente, dados estes, relativamente, semelhantes aos encontrados neste estudo. Entretanto, cabe salientar que os resultados apontados neste trabalho foram obtidos pelo emprego do SFPR em 100% de solvente e incubados a 30 °C por 5 h, enquanto que os referidos autores empregaram 1% de solvente no meio de reacional e posteriormente submetido à análise. Visando a aplicabilidade do sólido fermentado (SF) na síntese de ésteres em meio de solvente, estes resultados são promissores, uma vez que não há relatos na literatura utilizando a lipase de *P. roqueforti* com essa finalidade.

4.3.1.2 Estabilidade à temperatura

O estudo da temperatura é uma importante etapa quando se refere à estabilidade de enzimas em biocatálise. No que concerne a este fator, há dois mecanismos distintos que podem afetar consideravelmente a velocidade de reação catalisada por enzimas: o mecanismo químico, onde a velocidade de reação aumenta com a temperatura pelo aumento da energia cinética dos reagentes (substratos) e pelo aumento da transferência de massa, e o mecanismo associado à desnaturação da enzima pelo aumento da temperatura (NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005). Nas reações envolvendo síntese de ésteres catalisada por lipases, a faixa de temperatura para melhor desempenho do biocatalisador, compreende-se entre 30 e 50 °C (ALNOCH et al., 2015). No presente trabalho, as associações pertinentes a este parâmetro, também, puderam ser evidenciadas. Nos ensaios envolvidos nesta etapa, ambos os preparados foram submetidos à incubação em *n*-heptano por 5 h entre 30 – 60 °C e as atividades foram expressas em termos percentuais e comparadas aos seus respectivos controles, os quais não sofreram prévia incubação.

Os resultados dispostos na Figura 4.3 demonstram uma manutenção da estabilidade para a maior parte da faixa de temperatura estuda na incubação de LCRI e o SFPR, sendo observado pouco mais de 90% de atividade residual em 30 °C, para ambos os preparados. Na temperatura de 40 e 50 °C a atividade de LCRI não apresentou diferença significativa, mantendo-se em cerca de $44,6 \pm 3,7$ e $48,7 \pm 1,9\%$ para as respectivas temperaturas. Ao passo que para o SFPR, nestas mesmas temperaturas, as atividades residuais se mantiveram em $72,9 \pm 3,1$ e $63,4 \pm 0,2\%$, respectivamente. A 60 °C, o decréscimo foi bastante pronunciado em ambos os preparados, sendo observada uma atividade residual de $27,0 \pm 2,6\%$ para LCRI e $33,8 \pm 0,6\%$ para o SFPR. Estes resultados estão em conformidade com o embasamento teórico já relado, e no que se relaciona a maior resistência do SFPR em relação à LCRI, pode ser devido, também, ao efeito protetor promovido pelas outras enzimas existentes no meio fermentado bruto.

Figura 4.3 – Termoestabilidade da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em Accurel MP 1000 e do sólido fermentado de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110



Condições: para as amostras controle, não houve pré-incubação. A LCRI e o SFPR foram incubados, respectivamente, em 1 e 8 mL de *n*-heptano por 5 h.

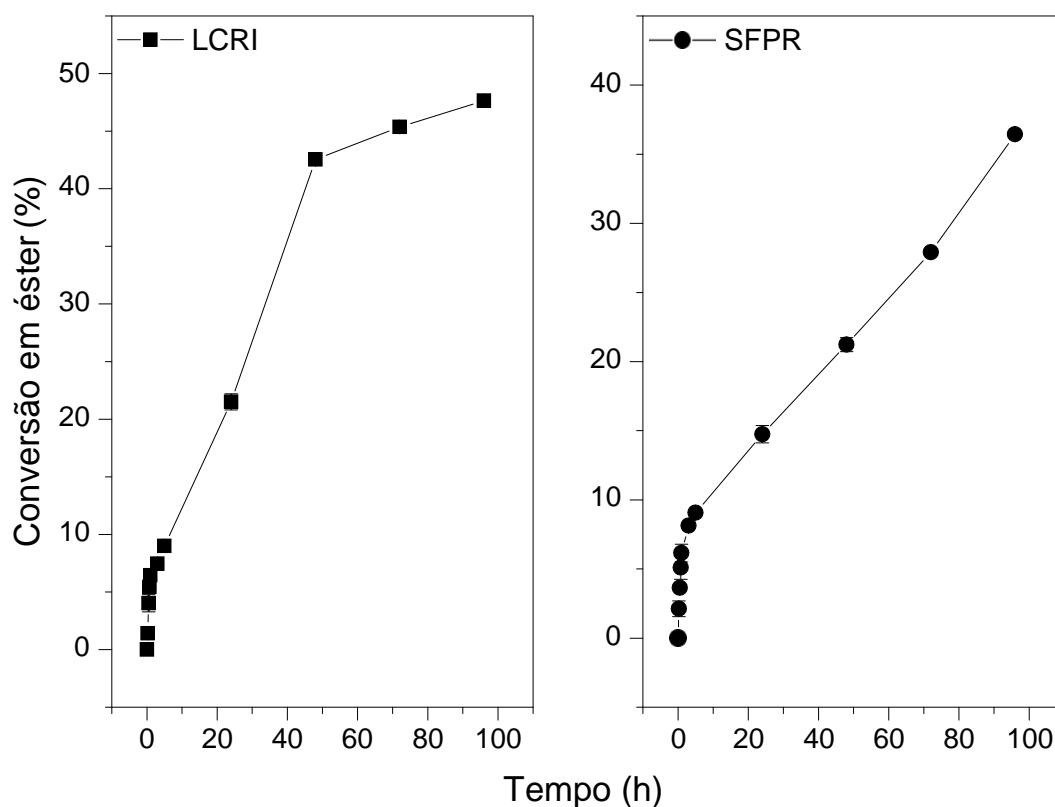
A atividade residual foi avaliada pela hidrólise da trioleína em meio orgânico a 40 °C e 180 rpm utilizando 40 e 350 mg da LCRI e do SFPR, respectivamente. O teor de ácidos graxos livres foi analisado pelo método de Lowry-Tinsley. Os valores apresentados são a média da triplicata dos ensaios \pm o EPM. Nos casos em que a barra do EPM não aparece, significa que esta é menor que símbolo que a representa.

No estudo de termoestabilidade, na faixa de 50 – 80 °C, do extrato bruto contendo lipase obtida através da FES do farelo de cacau por *P. roqueforti*, Silva et al., (2017) relataram uma perda de 25 e 50%, respectivamente, a 50 e 60 °C em 50 minutos de incubação. No período de incubação estudado pelos referidos autores, os resultados do presente trabalho se mostraram superiores, mesmo tendo sido adotado um maior tempo no estudo de estabilidade, o que pode estar relacionado a forma como a enzima interage com o sólido, podendo ser por meio de ligações de hidrogênio, conferindo maior estabilidade ao biocatalisador, enquanto que a lipase do estudo mencionado, extraída em FES, encontrava-se em sua forma livre, sendo mais propensa a sofrer desnaturação (KIM; GRATE; WANG, 2006), o que fortalece o emprego do sólido sem a necessidade de extração da enzima.

4.3.1.3 Atividade de esterificação e conversão em éster

As etapas anteriores foram determinantes na escolha das condições (solvente e temperatura) aplicadas para acompanhamento da reação de esterificação utilizando a LCRI e o SFPR (FIGURA 4.4). A lipase de *C. rugosa* já possui ocorrências na literatura no que concerne à faixa de temperatura mais adequada para aplicação em atividade de esterificação ou transesterificação (ADACHI et al., 2013; TALUKDER; WU; CHUA, 2010; WATANABE et al., 2007) o que está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo. No que se relaciona à lipase contida no SF por *P. roqueforti*, este é o primeiro relato onde se emprega o biocatalisador deste micro-organismo para aplicação em biocatálise.

Figura 4.4 – Esterificação catalisada pela lipase de *Candida rugosa* imobilizada em Accurel MP 1000 e pelo sólido fermentado de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110



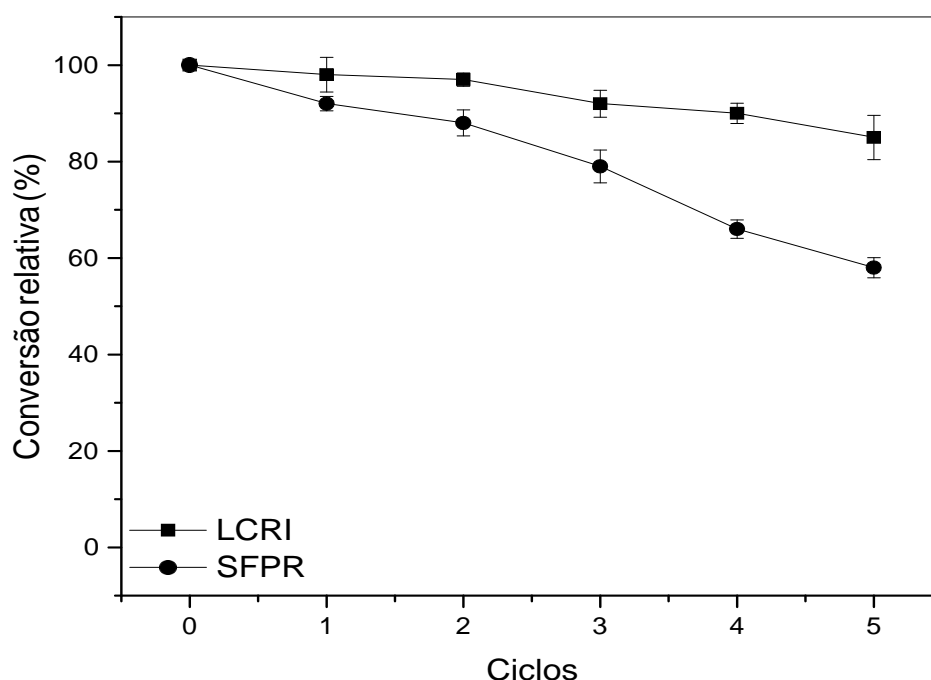
Condições da reação: (■) 100 mg do LCRI (6,5 U) e (●) 500 mg do SFPR (5,0 U); 5 e 10 mL de meio reacional para a LCRI e o SFPR, respectivamente. Proporção do meio em etanol de 210 mmol L⁻¹ e ácido oleico de 70 mmol L⁻¹ em *n*-heptano. Para ambos os ensaios a razão molar (etanol):(ácido oleico) foi de 3:1, 40 °C e 200 rpm. O teor de ácidos graxos residuais foi analisado pelo método de Lowry-Tinsley. Os valores apresentados são a média da triplicata dos ensaios ± o EPM. Nos casos em que a barra do EPM não aparece, significa que esta é menor que símbolo que a representa.

Conforme resultados apresentados na Figura 4.4, a LCRI apresentou atividade de esterificação (AE) de $8,2 \pm 0,0 \text{ U g}^{-1}\text{SS}$ e conversão em éster de $47,6 \pm 0,2\%$ em 96 h. Estes resultados foram superiores aos encontrados para o SFPR, que apresentou $3,4 \pm 0,1 \text{ U g}^{-1}\text{SS}$ para AE e conversão de $36,4 \pm 0,1\%$ em 96 h. Essa discrepância concernente à AE e à taxa de conversão para a LCRI e o SFPR pode estar associada à pureza da enzima comercial (apresentando maior quantidade de U em uma menor massa do derivado imobilizado) que mesmo neste caso não apresentou uma diferença tão elevada em relação ao SFPR.

4.3.1.4 Reutilização da LCRI e do SFPR na síntese de ésteres em *n*-heptano

Para finalização da etapa de caracterização da LCRI e do SFPR, um estudo de reutilização foi conduzido a fim de avaliar a estabilidade desses preparados frente à sucessivos ciclos de síntese (FIGURA 4.5).

Figura 4.5 – Reuso da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em Accurel MP 1000 e do sólido fermentado de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110



Condições da reação: (■) 100 mg do LCRI (6,5 U) e (●) 500 mg do SFPR (5,0 U); 5 e 10 mL de meio reacional para a LCRI e o SFPR, respectivamente. Proporção do meio em etanol de 210 mmol L^{-1} e ácido oleico de 70 mmol L^{-1} em *n*-heptano. Para ambos os ensaios a razão molar (etanol):(ácido oleico) foi de 3:1, $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 200 rpm. O teor de ácidos graxos residuais foi analisado pelo método de Lowry-Tinsley. Os valores apresentados são a média da triplicata dos ensaios \pm o EPM. Nos casos em que a barra do EPM não aparece, significa que esta é menor que símbolo que a representa.

Os resultados demonstraram alta estabilidade nas reações de esterificação para a LCRI, mantendo quase que total eficiência durante os 5 ciclos, apresentando apenas cerca de 15% de perda no último ciclo. No que concerne ao SFPR, foi apresentada relativa estabilidade, variando até cerca de 80% de conversão residual até o 3º ciclo, e uma queda mais pronunciada no último reuso, restando cerca de 60% de conversão em relação ao ciclo inicial. Mesmo tendo apresentado uma queda maior nos ciclos de reação, os resultados para o SF são promissores, uma vez que sendo a enzima utilizada em sua forma livre, a reutilização fica inviável, aumentando assim o custo do processo. O SFPR tem seu primeiro relato na produção de biodiesel neste trabalho.

Fernandes et al., (2007) propuseram pela primeira vez o uso e reuso de sólido fermentado em reações de biocatálise. Os autores avaliaram o reuso do SF por *Burkholderia cepacia* LTEB11 em reações de esterificação em *n*-heptano relatando conversão inicial de 97%, mantida até 10 ciclos de reação, sendo observada uma queda mais pronunciada para aproximadamente 48% após o 14º ciclo. O reuso do SF de *Rhizopus microsporus* na síntese de ésteres foi relatado por Botton (2014) sendo observada por 23 ciclos conversões em torno de 100%, e uma pequeno decréscimo para 86% após o 24º ciclo. Os resultados dos estudos citados para o reuso do SF foram superiores aos do presente trabalho, contudo os experimentos conduzidos aqui, mostraram-se promissores e as respostas obtidas com o emprego dos preparados produzidos neste estudo, em especial o SFPR, poderão ser maximizadas em estudos posteriores.

4.4 CONCLUSÃO

Foi desenvolvido neste trabalho um estudo de caracterização comparativa entre a LCRI e o SFPR. O uso de uma enzima comercial, já amplamente relatada na literatura, fez-se necessária para essa análise comparativa em relação ao SF.

O SFPR mostrou-se estável a diferentes solventes, destacando-se o fato de ter apresentado maior atividade residual e conseqüentemente maior estabilidade em solventes orgânicos mais hidrofílicos, fato este menos pronunciado para a LCRI. As atividades residuais para LCRI e o SFPR foram, respectivamente, em EtOH de $13,0 \pm 0,6$ e $68,0 \pm 1,1\%$ e em MeOH de 0 e $26,6 \pm 0,4\%$.

A termoestabilidade estudada para ambos os preparados, também apresentou a mesma tendência observada no estudo de estabilidade aos solventes. O SFPR apresentou-se mais estável na faixa de temperatura estudada em relação à LCRI. Para ambos os estudos, esse fato se traduz na presença de outras enzimas presentes no SF bruto, que, como já mencionado, podem ter promovido uma espécie de proteção às lipases presentes no sólido.

Quando comparados quanto ao estudo de AE e conversão em éster, a LCRI apresentou maior conversão no tempo de reação empregado, sendo a AE para a LCRI de $8,2 \pm 0,0$ e para o SFPR de $3,4 \pm 0,1$ U g⁻¹SS. Esses resultados evidenciaram valores de conversão em $47,6 \pm 0,2$ e $36,4 \pm 0,1\%$, respectivamente, para a LCRI e o SFPR. Quanto ao reuso, a LCRI permaneceu estável, quase que em 100% de conversão relativa nos 5 ciclos de reação estudados. O SFPR apresentou relativa estabilidade tendo uma queda mais pronunciada a partir do 3º ciclo e ao fim destes, apresentou atividade relativa em torno de 60%. Estes resultados são bastantes promissores, pois permitiram evidenciar a reutilização do SFPR, o que já é demonstrado na literatura como uma alternativa ao uso de enzimas imobilizadas, e que neste caso, também, pode reduzir o custo final do processo.

4.5 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados promissores obtidos pelo emprego do sólido fermentado contendo lipases de *P. roqueforti* ATCC 10110, o presente trabalho abre perspectivas para novos estudos, tais como:

- Otimização da reação de esterificação para síntese do oleato de etila com aplicação do SFPR para obtenção de maiores rendimentos;
- Aplicação do SFPR em resolução de compostos racêmicos, como por exemplo, resolução do 1-feniletanol;
- Aplicação do SFPR na síntese de ésteres de aroma;
- Aplicação do SFPR, em escala laboratorial, na biorremediação de efluentes industriais.

4.6 AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa científica. À Universidade Estadual de Santa Cruz e à Universidade Federal do Paraná pelo apoio técnico e administrativo.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, D.; HAMA, S.; NAKASHIMA, K.; BOGAKI, T.; OGINO, C.; KONDO, A. Production of biodiesel from plant oil hydrolysates using an *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst highly expressing *Candida antarctica* lipase B. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 410–416, 2013.
- ALNOCH, R. C.; MARTINI, V. P.; GLOGAUER, A.; COSTA, A. C. D. S.; PIOVAN, L.; MULLER-SANTOS, M.; SOUZA, E. M. DE; PEDROSA, F. D. O.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Immobilization and characterization of a new regioselective and enantioselective lipase obtained from a metagenomic library. **Plos One**, v. 10, p. 1–12, 2015.
- BOTTON, V. **Síntese de ésteres etílicos catalisada pela adição direta de sólido fermentado de *Rhizopus microsporus* CBPQA 312-07 DRM em sistema livre de solventes**. 2014. 140 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná, 2014.
- DIAS, G. S.; LUZ, L. F. DE L.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Scale-up of biodiesel synthesis in a closed-loop packed-bed bioreactor system using the fermented solid produced by *Burkholderia lata* LTEB11. **Chemical Engineering Journal**, v. 316, p. 341–349, 2017.
- FERNANDES, M.; SAAD, E.; BOLZANI, E.; MEIRA, J.; RAMOS, L.; MITCHELL, D.; 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.
- FERRAZ, J. L. DE A. A.; SOUZA, L. O.; SOARES, G. A.; COUTINHO, J. P.; OLIVEIRA, J. R. DE; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; FRANCO, M. Enzymatic saccharification of lignocellulosic residues using cellulolytic enzyme extract produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivated on residue of yellow mombin fruit. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 214–220, 2018.
- GONÇALVES, A. P. V. **Imobilização de uma cutinase recombinada no zeólito NaY: estudos cinéticos e de estabilidade**. 1999. 246 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Técnica de Lisboa, 1999.
- KIM, J.; GRATE, J. W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 1017–1026, 2006.
- LESSA, O. A.; REIS, N. DOS S.; LEITE, S. G. F.; GUTARRA, M. L. E.; SOUZA, A. O.; GUALBERTO, S. A.; OLIVEIRA, J. R. DE; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; FRANCO, M. Effect of the solid state fermentation of cocoa shell on the secondary metabolites, antioxidant activity, and fatty acids. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, p. 107–113, 2017.
- LOWRY, R. R.; TINSLEY, I. J. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 53, p. 470–472, 1976.
- MADALAZZO, A.; MUNIZ, L.; BARON, A.; PIOVAN, L.; MITCHELL, D.; KRIEGER, N. Characterization of an immobilized recombinant lipase from *Rhizopus oryzae*:

Synthesis of ethyl-oleate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 1–7, 2013.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 769–777, 2005.

SALUM, T. F. C.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; YAMAMOTO, C. I.; CÔCCO, L. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1348–1354, 2010.

SILVA, T. P.; SOUZA, L. O.; SILVA, N. R.; ASSIS, S. A.; FERRERIA, M. L. O.; OLIVEIRA, J. R.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; FRANCO, M. Cultivation of *Penicillium roqueforti* in cocoa shell to produce and characterize its lipase extract. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 16, p. 745–756, 2017.

SOARES, D.; PINTO, A. F.; GONÇALVES, A. G.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 15–23, 2013.

TALUKDER, M. M. R.; WU, J. C.; CHUA, L. P. L. Conversion of waste cooking oil to biodiesel via enzymatic hydrolysis followed by chemical esterification. **Energy and Fuels**, v. 24, p. 2016–2019, 2010.

WANG, Y.; ZHANG, D. H.; ZHANG, J. Y.; CHEN, N.; ZHI, G. Y. High-yield synthesis of bioactive ethyl cinnamate by enzymatic esterification of cinnamic acid. **Food Chemistry**, v. 190, p. 629–633, 2016.

WATANABE, Y.; NAGAO, T.; NISHIDA, Y.; TAKAGI, Y.; SHIMADA, Y. Enzymatic production of fatty acid methyl esters by hydrolysis of acid oil followed by esterification. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, n. 11, p. 1015–1021, 2007.

YANG, C.; WANG, F.; LAN, D.; WHITELEY, C.; YANG, B.; WANG, Y. Effects of organic solvents on activity and conformation of recombinant *Candida antarctica* lipase A produced by *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 533–537, 2012.

ZAGO, E.; BOTTON, V.; ALBERTON, D.; CÓRDOVA, J.; YAMAMOTO, C. I.; CÔCCO, L. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Synthesis of ethylic esters for biodiesel purposes using lipases naturally immobilized in a fermented solid produced using *Rhizopus microsporus*. **Energy and Fuels**, v. 28, p. 5197–5203, 2014.