

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**Obtenção de lipase microbiana a partir de
sementes de abóbora e avaliação do potencial
de imobilização da enzima**

Rafaela Cristiane Andrade Santos

São Cristóvão / SE
Fevereiro- 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**Obtenção de lipase microbiana a partir de
sementes de abóbora e avaliação do potencial
de imobilização da enzima.**

Rafaela Cristiane Andrade Santos

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos como
requisito parcial à obtenção do título de
MESTRE EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciana Cristina Lins de Aquino

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Cleide Mara Faria Soares

Agência Financiadora: FAPITEC/SE

São Cristóvão-SE
Fevereiro-2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

PARECER FINAL DO JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Obtenção de lipase microbiana a partir de
sementes de abóbora e avaliação do potencial de
imobilização da enzima**

Autor: Rafaela Cristiane Andrade Santos

Orientadora : Prof^a Dr^a Luciana Cristina Lins de Aquino

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Cleide Mara Faria Soares

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Luciana Cristina Lins de Aquino

Orientadora – NUCTA/UFS

Prof Dr Narendra Narain

Examinador interno – NUCTA/UFS

Prof Dr Álvaro Silva Lima

Examinador Externo - UNIT

VITAE DO CANDIDATO

Rafaela Cristiane Andrade Santos, filha de Adilson Vieira dos Santos e Maria Isabel de Andrade Santos, nascida em Aracaju/Se em 05/09/1986.

Iniciou o curso de graduação em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Sergipe em 2004, concluindo em 2009.

Foi bolsista do CNPq, nos anos de 2006 e 2007, no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe (UFS) nos projetos de pesquisa: Compostos voláteis em polpa de mangaba: análise por headspace dinâmico e Estudo sobre bebidas fermentadas preparadas pelo uso das frutas laranja (*Citrus aurantium* L.) e umbu (*Spondia tuberosa* Arruda Câmara), sob a orientação do professor Dr. Narendra Narain.

Em março de 2009, iniciou o curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos em nível de mestrado na Universidade Federal de Sergipe.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre comigo, me guiando e dando forças para nunca desistir de meus objetivos, por permitir que eu concretizasse mais esse sonho e por me agradecer com a vida de parentes e amigos que me ajudaram a tornar essa caminhada menos árdua.

A minha mãe Isabel, pelo amor, carinho, incentivo em todas as horas. Ao meu irmão, Adilson, pela paciência e amizade.

Aos meus avós, Ruth, Raulina, Valdomiro e Antônio, presentes de Deus, por torcerem por mim e por nunca medirem esforços para me ajudar, em quaisquer que fossem as situações.

Ao meu namorado Júnior, por toda compreensão, pelo amor, pelo incentivo e pelo auxílio na realização dos experimentos.

Aos amigos do laboratório: Kyzzes, Jennifer, Jojo, Mônica, Geanderson, Valdeci, Yure, Sheila, Ana Tereza, Fernanda, Janaina, Thais pela amizade e por todos os momentos de descontração, conversas e brincadeiras.

A Fernanda, Yara, Gleise, Rafaela e Mariana por me oferecerem ajuda sempre que possível. Aos amigos Murillo Barbosa, Márcio Mazzuti, Aline Alves e Gláucia Vieira por estarem sempre prontos a me ajudar. Muito obrigada!

Aos meus amigos, André, Denisson, Emídio, Rosane, Luciana, Manu, Thamires, Xuxu e Celma pela amizade e por estarem sempre comigo.

A Professora Luciana, pela orientação, apoio e confiança durante a realização deste trabalho.

A professora Cleide, pelo auxílio e pelo direcionamento na realização dos experimentos.

A todos os professores da graduação e da pós-graduação que contribuíram bastante para minha formação.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Obtenção de lipase microbiana a partir de sementes de abóbora e avaliação do potencial de imobilização da enzima

RESUMO

As enzimas, devido às suas propriedades catalíticas, vêm sendo largamente utilizadas em processos industriais na forma livre ou imobilizada. Dentre elas destacam-se as lipases, que atuam sobre ligações ésteres presentes em acilgliceróis e podem ser produzidas através da fermentação em estado sólido (FES), possibilitando o aproveitamento de resíduos agroindustriais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da farinha de sementes de abóbora para a obtenção de lipase de *Aspergillus niger* e posterior imobilização da enzima em matrizes hidrofóbicas. As fermentações foram realizadas segundo planejamento experimental variando-se a umidade do substrato entre 30% e 60% e a temperatura entre 30°C e 40°C. A interação entre a temperatura e a umidade foi o parâmetro que mais influenciou o processo fermentativo ao nível de 95% de confiança, sendo os máximos de atividade hidrolítica obtidos em temperatura entre 26,0 e 33,5 °C e umidade inicial do resíduo entre 20% e 30%. A imobilização da lipase pré-purificada por adsorção física em sílica proporcionou maior rendimento (81,85%) dentre as matrizes testadas. A enzima livre apresentou maior atividade hidrolítica em pH 4,0, demonstrando caráter ácido, e em temperatura de 37 °C. Entretanto, quando imobilizada em sílica o pH e temperatura de maior atividade hidrolítica foram 11,0 e 50 °C, respectivamente. A lipase livre apresentou estabilidade em pH 6,0 à 30 °C e o biocatalisador imobilizado (BI) em pHs 4,0; 6,0 e 11,0 à 37 °C durante quatro horas. Nas condições de hidrólise de azeite de oliva, o BI apresentou menor velocidade máxima de reação ($V_{máx} = 0,020$ U/ mg) e menor afinidade pelo substrato, caracterizado pelo maior valor de K_m (130,1 mmol) do que os obtidos pela enzima livre ($V_{máx} = 0,028$ U/ mg; $K_m = 119,0$ mmol). A caracterização bioquímica e os parâmetros cinéticos permitem determinar as condições mais adequadas para aplicações futuras da enzima em processos de interesse industrial. As sementes de abóbora, que possuem cerca de 43% de lipídeos, demonstraram potencial para a utilização como substrato natural em FES visando a obtenção de lipase produzida pelo *Aspergillus niger*.

Palavras-Chave: lipase, fermentação em estado sólido, matrizes hidrofóbicas, imobilização.

Microbial lipase production through pumpkin seeds and evaluation of the enzyme immobilization potential

ABSTRACT

The enzymes, due to their catalytic properties have been widely used in industrial processes in the free or immobilized forms. Among them, are the lipases, acting on ester bonds presents in acylglycerols and may be produced by solid state fermentation (SSF), allowing the use of agro-industrial residues. The aim of this work was to evaluate the potential of pumpkin seed flour to obtain lipase from *Aspergillus niger* and subsequent immobilization of the enzyme in hydrophobic matrices. The fermentations were performed according to experimental design varying the substrate moisture between 30 and 60% and the temperature between 30 and 40 °C. The interaction between temperature and moisture was the parameter that most influenced the fermentative process at 95% confidence, with the maximum hydrolytic activity obtained at temperatures between 26,0 and 33,5 °C and initial moisture content of the residue between 20 and 30%. Lipase pre-purified immobilization by adsorption on silica showed highest yield (81,85%) among the tested matrices. Free enzyme showed highest hydrolytic activity at pH 4,0, showing acidic character, and at 37 °C. However, when immobilized on silica the pH and temperature of greater hydrolytic activity were at 11,0 and 50 °C, respectively. Free lipase was stable at pH 6,0 at 30 °C and the immobilized biocatalyst (BI) at pH 4,0, 6,0 and 11,0 at 37 °C for four hours. Under conditions of olive oil hydrolysis, BI showed a lower speed of reaction ($V_{m\acute{a}x} = 0,020$ U/ mg) and lower affinity for the substrate, characterized by the higher value of K_m (130,1 mmol) than those obtained by the free enzyme ($V_{m\acute{a}x} = 0,028$ U/ mg; $K_m = 119,0$ mmol). Biochemical characterization and kinetic parameters allow determination of the most appropriate conditions for future applications of the enzyme in processes of industrial interest. Pumpkin seeds, which have about 43% lipids, showed potential for use as natural substrate in SSF in order to obtain lipase from *Aspergillus niger*.

Keywords: lipase, solid state fermentation, hydrophobic matrices, immobilization.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
SUMÁRIO.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	10
CAPÍTULO I: Produção de lipase de <i>Aspergillus niger</i> através da fermentação em estado sólido da farinha de sementes de abóbora.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Aproveitamento de Resíduos.....	18
2.1.1 Sementes de Abóbora.....	19
2.2 Fermentação em Estado Sólido (FES).....	20
2.3 Lipases Microbianas.....	23
2.4 Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Matéria-prima.....	31
3.2 Microrganismo.....	31
3.3 Metodologia Experimental.....	31
3.3.1 Preparo da farinha de sementes de abóbora.....	31
3.3.2 Caracterização físico-química da farinha de sementes de abóbora	32
3.3.3 Produção de lipase microbiana a partir de resíduos de sementes de abóbora.....	33
3.3.4 Crescimento microbiano.....	34
3.3.5 Extração da enzima presente nos fermentados.....	35
3.3.6 Determinação da atividade hidrolítica.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 Caracterização físico-química da farinha de sementes de abóbora.....	37
4.2 Cinética de produção de lipase.....	38

4.3 Cinética do crescimento microbiano.....	43
4.4 Influência de parâmetros na produção de lipase por fermentação em estado sólido - Análise de superfície de resposta.....	44
5. CONCLUSÃO.....	49
CAPÍTULO II: Avaliação do potencial de imobilização da lipase de <i>Aspergillus niger</i> em matrizes hidrofóbicas: Caracterização bioquímica da enzima na forma livre e imobilizada.....	50
RESUMO.....	51
ABSTRACT.....	52
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	55
2.1 Métodos de imobilização de enzimas.....	55
2.2 Vantagens e Limitações da Técnica de Imobilização.....	60
2.3 Suportes para a Imobilização de Enzimas.....	61
2.3.1 Imobilização de lipases em matriz hidrofóbica sol-gel.....	63
2.3.2 Imobilização de lipases em Membranas Poliméricas.....	64
2.3.2.1 Membranas de Poliétersulfona.....	65
2.4 Propriedades catalíticas das lipases fúngicas.....	66
2.4.1 Cinética Enzimática.....	68
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
3.1 Materiais.....	71
3.2 Metodologia Experimental.....	71
3.2.1 Purificação parcial da lipase produzida.....	71
3.2.2 Preparo dos biocatalisadores imobilizados.....	72
3.2.2.1 Imobilização da enzima em matrizes hidrofóbicas por adsorção física.....	72
3.2.2.2 Ativação das matrizes hidrofóbicas.....	72
3.2.2.3 Imobilização da enzima por ligação covalente nos suportes ativados.....	72
3.2.3 Determinação da Atividade Hidrolítica.....	74
3.2.4 Quantificação do teor de proteínas nos filtrados.....	75
3.2.5. Determinação do teor de umidade dos biocatalisadores imobilizados.....	75
3.2.6 Rendimento da Imobilização (%)......	75
3.2.7 Propriedades catalíticas da lipase pré-purificada e do biocatalisador imobilizado.....	76

3.2.7.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática.....	76
3.2.7.2 Estabilidade em pH.....	76
3.2.7.3 Estabilidade térmica.....	76
3.2.7.4 Cinética Enzimática: Determinação dos parâmetros K_m e $V_{máx}$	77
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
4.1 Avaliação do potencial de imobilização da lipase pré-purificada em sílica e em membrana de fibra oca de poliétersulfona.....	78
4.1.1 Determinação da concentração de glutaraldeído para ativação dos suportes.....	78
4.1.2 Rendimento de imobilização da lipase pré-purificada em sílica e em membrana de fibra oca de poliétersulfona.....	79
4.2 Caracterização bioquímica da lipase pré-purificada e do biocatalisador imobilizado (BI).....	80
4.2.1 Efeito do pH.....	80
4.2.2 Efeito da temperatura.....	82
4.2.3 Estabilidade da lipase pré-purificada e do BI em diferentes pHs.....	83
4.2.4 Estabilidade térmica da lipase pré-purificada e do BI.....	85
4.2.5 Determinação dos parâmetros cinéticos da lipase pré-purificada e do BI.....	88
5. CONCLUSÃO.....	91
CONCLUSÃO GERAL.....	92
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
ANEXO I.....	123
ANEXO II.....	124
ANEXO III.....	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Algumas aplicações industriais da lipase.....	28
Tabela 2. Matriz do delineamento composto central rotacional empregado no estudo da produção de lipase por FES.....	34
Tabela 3. Características físico-químicas da farinha de sementes de abóbora.....	37
Tabela 4. Níveis codificados e valores reais das variáveis independentes do planejamento fatorial e atividade hidrolítica durante as fermentações.....	39
Tabela 5. Matriz do planejamento experimental para a produção de lipase através da FES, com os valores reais, codificados e o máximo de atividade hidrolítica	45
Tabela 6. Análise de variância para a atividade hidrolítica produzida por FES.....	47
Tabela 7. Características bioquímicas de lipases livre e imobilizadas.....	67
Tabela 8. Constante de inativação térmica e tempo de meia-vida para a lipase pré-purificada.....	87
Tabela 9. Correlações testadas para determinação dos parâmetros cinéticos	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Crescimento de <i>Aspergillus niger</i> em casca de maracujá	20
Figura 2. Estrutura molecular da lipase de origem fúngica.....	24
Figura 3. Representação esquemática de reações catalisadas por lipases	26
Figura 4. Sementes de abóbora (a); Farinha de sementes de abóbora (b)	31
Figura 5. FES da farinha de sementes de abóbora utilizando <i>Aspergillus niger</i>	33
Figura 6. Cinética da fermentação em estado sólido para produção de lipase utilizando temperatura e umidade inicial da farinha, de respectivamente 30°C e 30% (EXP1) e 40°C e 30% (EXP2).....	40
Figura 7. Cinética da fermentação em estado sólido para produção de lipase utilizando temperatura e umidade inicial da farinha, de respectivamente 30°C e 60% (EXP3) e 40°C e 60% (EXP4).....	40
Figura 8. Cinética da fermentação em estado sólido para produção de lipase utilizando temperatura e umidade inicial da farinha, de respectivamente 28°C e 45% (EXP5) e 42°C e 45% (EXP6).....	41
Figura 9. Cinética da fermentação em estado sólido para produção de lipase utilizando temperatura e umidade inicial da farinha, de respectivamente 35°C e 24% (EXP7) e 35°C e 66% (EXP8).....	41
Figura 10. Cinética da fermentação em estado sólido para produção de lipase utilizando temperatura e umidade inicial da farinha, de respectivamente 35°C e 45% (PC1, PC2, PC3 e PC4).....	42
Figura 11. Cinética de produção de lipase do experimento 1 (umidade 30%, temperatura 30 °C) realizado em triplicata.....	42
Figura 12. Quantificação indireta do crescimento fúngico através da concentração de glicosamina.....	43
Figura 13. Gráfico de Pareto para produção de lipase através da FES	46
Figura 14. Superfície de resposta para a atividade hidrolítica produzida através da FES	47
Figura 15. Curva de contorno para a atividade hidrolítica produzida através da FES ...	48
Figura 16. Métodos de imobilização de enzimas em suportes	57
Figura 17. Principais métodos de imobilização de enzimas.....	60
Figura 18. Estrutura química da poliétersulfona	66

Figura 19. Lipase parcialmente purificada e liofilizada.....	71
Figura 20. Esquema de preparo dos biocatalisadores imobilizados	73
Figura 21. Rendimento de imobilização da lipase parcialmente purificada em membranas de poliétersulfona ativadas com diferentes concentrações de glutaraldeído (% , v/v).....	78
Figura 22. Determinação do suporte com maior potencial de imobilização	79
Figura 23. Efeito do pH na atividade relativa da lipase parcialmente purificada e do biocatalisador imobilizado	81
Figura 24. Efeito da temperatura na atividade relativa da lipase parcialmente purificada e do biocatalisador imobilizado	82
Figura 25. Estabilidade em diferentes pHs da lipase parcialmente purificada de <i>Aspergillus niger</i>	84
Figura 26. Estabilidade em diferentes pHs do biocatalisador imobilizado	85
Figura 27. Estabilidade térmica da lipase parcialmente purificada de <i>Aspergillus niger</i>	86
Figura 28. Estabilidade térmica do biocatalisador imobilizado	86
Figura 29. Representação de Hanes-Wolf para a hidrólise do azeite de oliva pela lipase parcialmente purificada.....	89
Figura 30. Representação de Hanes-Wolf para a hidrólise do azeite de oliva pelo BI... ..	90

INTRODUÇÃO GERAL

As enzimas vêm ganhando cada vez mais atenção no mercado biotecnológico, devido ao seu potencial de utilização em vários setores industriais. A exploração da biodiversidade na busca de novos catalisadores, por meio de técnicas de seleção de microrganismos, plantas ou células animais, representam os métodos tradicionais de descoberta de novas enzimas para o desenvolvimento da biocatálise em escala industrial, muitas vezes utilizando também resíduos agroindustriais como substrato em processos fermentativos para a obtenção de enzimas (ELLAIAH *et al.*, 2004b).

Dentre as enzimas de grande interesse industrial, a lipase (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3), é classificada como hidrolase e atua sobre ligações ésteres presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases (JI *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2009; DEMIR & TUKEL, 2010).

Por possuírem uma alta atividade catalítica em comparação com os catalisadores convencionais e por atuarem com alta eficiência em condições reacionais bastante suaves, as lipases podem ser utilizadas em uma vasta gama de processos industriais tais como: melhoramento dos fios e tecidos na indústria têxtil, aumento na branquidão do papel na indústria de papel, redução do impacto ambiental de produtos detergentes na indústria de detergentes, síntese de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta e alcoóis na indústria de aromas, melhora o aroma e acelera a fermentação de vinhos, atua nas etapas de fermentação de salsichas, melhora o sabor do leite de soja, hidrólise da gordura do leite na indústria de laticínios, intensificação do sabor dos queijos e aceleração do processo de maturação, dentre outros (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; HASAN *et al.*, 2006).

As lipases de origem microbiana são as mais utilizadas e, na sua grande maioria não são nocivas à saúde humana, sendo conhecidas como “Generally Recognized as Safe - GRAS” (JAEGER *et al.*, 1994). Sob o ponto de vista industrial, os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas são, em sua maioria, extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação, além de suas enzimas serem mais estáveis do que as produzidas por outras fontes. As enzimas podem ser produzidas por fermentação submersa (FSm) ou fermentação em estado sólido (FES) (VULFSON *et al.*, 1994; SHARMA *et al.*, 2001).

A fermentação em estado sólido é um dos métodos mais utilizados para a produção de lipase, através dos fungos filamentosos, que são os principais produtores da enzima (CARVALHO *et al.*, 2005). Na FES, as condições de crescimento aproximam-se do habitat natural de fungos, pois utiliza substratos com baixa atividade de água (SILVA *et al.*, 2005; MENONCIN *et al.*, 2009). Uma grande variedade de resíduos agroindustriais pode ser utilizada como substrato na FES: farelo de soja, farelo de trigo, sementes de abóbora, entre outros. A utilização de tais resíduos tem sido motivada pelo seu baixo custo, pelas características físico-químicas, e, a depender da região geográfica, pela sua disponibilidade (MAHADIK *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2005; MENONCIN *et al.*, 2009). Alguns fatores influenciam o processo fermentativo em estado sólido, tais como: temperatura, pH, umidade, aeração, concentração do inóculo e tipo do substrato, dependendo da espécie do microrganismo. Assim, é muito importante conhecer as condições do meio de fermentação para maximizar a produção dos compostos de interesse (ELLIAH *et al.*, 2004b; ROUSSOS *et al.*, 1991).

As enzimas, após o processo de recuperação final, são utilizadas em escala industrial, tanto na forma livre como na forma imobilizada. A técnica de imobilização consiste em restringir o movimento da enzima, por meio do seu confinamento numa certa região do espaço (o suporte), com retenção de sua atividade catalítica, podendo ser usada repetida e continuamente em reatores contínuos, com fácil separação de catalisador-produto, e aumento da produtividade do processo (massa de produto formado/ unidade de tempo). Esta é uma grande vantagem da enzima imobilizada sobre a livre e, um ponto muito importante a ser considerado, pois enzimas são caras, e quando estão na forma livre não permitem reuso (SEBRÃO *et al.*, 2007; PAULA *et al.*, 2008; KARTAL *et al.*, 2009).

A imobilização de enzimas pode ocorrer por vários métodos e, em todos eles o complexo enzima-suporte mantém as características físicas do suporte e retém a atividade biológica da enzima na forma solúvel (PAULA *et al.*, 2008). No entanto, o melhor método de imobilização deve estar de acordo com a finalidade do produto e com as características específicas da enzima. É importante ressaltar a necessidade de que o suporte escolhido resulte em preparados imobilizados com elevadas atividades e características hidrodinâmicas adequadas ao uso em reatores (PAULA *et al.*, 2008). Vários são os suportes utilizados para a imobilização de enzimas, dentre eles: sílica

(SOARES *et al.*, 1999), membrana de polisulfona (YUJUN *et al.*, 2008), PVA (HUANG *et al.*, 2007; WANG & HSIEH, 2008) e quitosana (BITENCOURT & PEREIRA, 2006; HUANG *et al.*, 2007).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi a obtenção de lipase microbiana a partir da fermentação em estado sólido da farinha de sementes de abóbora, resíduo comumente descartado em lixos, e avaliação do potencial de imobilização da enzima em suportes poliméricos.

CAPÍTULO I

Produção de lipase de *Aspergillus niger* através da fermentação em estado sólido da farinha de sementes de abóbora

RESUMO

SANTOS, R. C. A., MSc., Universidade Federal de Sergipe; Fevereiro, 2011. **Fermentação em estado sólido da farinha de sementes de abóbora para a obtenção de lipase fúngica: Avaliação da influência de parâmetros no processo através da metodologia de superfície de resposta.** Orientadora: Luciana Cristina Lins de Aquino.

Os resíduos agroindustriais têm apresentado grande potencial para utilização como matriz sólida em fermentação em estado sólido, por possuírem baixo custo, por apresentarem em sua composição, matéria orgânica passível de consumo pelos microrganismos e pela possibilidade de obtenção de produtos de alto valor agregado, como as enzimas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de farinha de sementes de abóbora para a obtenção de lipase utilizando o fungo *Aspergillus niger*. As fermentações foram realizadas segundo planejamento experimental empregando a matriz 2² com 4 repetições no ponto central e 4 pontos axiais, variando-se a umidade do substrato entre 30% e 60% e a temperatura entre 30°C e 40°C. Para cada experimento determinou-se a cinética de produção de lipase, sendo o máximo de atividade hidrolítica (71,88 U/g seca) obtido em 120 horas de fermentação quando utilizado resíduo contendo umidade inicial de 30% e temperatura do processo de 30 °C. A interação temperatura e umidade foi o parâmetro que mais influenciou o processo fermentativo ao nível de 95% de confiança, sendo os máximos de atividade hidrolítica obtidos em temperatura entre 26,0 e 33,5 °C e umidade inicial do resíduo entre 20% e 30%. A farinha de sementes de abóbora, a qual possui cerca de 43% de lipídeos, demonstrou potencial como substrato natural (sem adição de suplementos) para a obtenção de lipase fúngica de *Aspergillus niger*.

Palavras-Chave: lipase, *Aspergillus niger*, resíduo agroindustrial, superfície de resposta.

ABSTRACT

SANTOS, R. C. A., MSc., Universidade Federal de Sergipe; Fevereiro, 2011. **Solid state fermentation of pumpkin seeds flour to obtain fungal lipase: Evaluation of the parameters influence in the process through response surface methodology.**
Orientadora: Luciana Cristina Lins de Aquino.

Agro-industrial residues have shown great potential for use as solid matrix in solid state fermentation, by having low cost, presenting in its composition organic matter susceptible to consumption by microorganisms and the possibility of obtaining products of high added value, such as enzymes. In this context, the aim of this work was evaluating the potential of pumpkin seed flour to obtain lipase by the fungus *Aspergillus niger*. Fermentations were performed according to the experimental design using the matrix 2^2 with four replications at the central point and four axial points, varying the substrate humidity between 30 and 60% and temperature between 30 and 40 °C. The kinetics of lipase production was determined for each experiment, and the maximum of hydrolytic activity (71,88 U/g dry weight) obtained in 120 hours of fermentation when using 30% as initial moisture content of the residue and process temperature of 30 °C. The interaction between temperature and moisture was the parameter that most influenced the fermentative process at 95% confidence, with the maximum hydrolytic activity obtained at temperatures between 26,0 and 33,5 °C and initial moisture content of the residue between 20 and 30%. Pumpkin seeds flour, which have about 43% lipids, showed potential as natural substrate (no added supplements) in order to obtain lipase from *Aspergillus niger*.

Keywords: lipase, *Aspergillus niger*, agro-industrial residue, response surface.

1 - INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas eficazes na catálise de reações bioquímicas. Dentre as propriedades desses catalisadores estão a especificidade e o poder catalítico. A maioria delas pode ser altamente específica pelo substrato e catalisar reações sob condições suaves, reduzindo a energia necessária para alcançar o estado de transição e sem alterar o equilíbrio da reação. A especificidade das enzimas depende da conformação do sítio ativo (BAYINDIRLI, 2010).

Dentre as enzimas de maior interesse industrial destacam-se as lipases, que são hidrolases que atuam nas ligações éster de triacilgliceróis, tendo como substrato natural os compostos lipídicos. Estas enzimas podem ser produzidas por plantas, animais, bactérias e fungos (POLAINA & MACCABE, 2007). As lipases podem ser utilizadas em uma vasta gama de processos industriais tais como: redução do tempo de fermentação na indústria cervejeira, amaciamento de pães, melhorando a estrutura do miolo e controla o escurecimento não-enzimático; aprimoramento do aroma e hidrólise da gordura do leite na indústria de laticínios; síntese de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta e alcoóis (HASSAN *et al.*, 2006).

As enzimas produzidas por fungos são as que, atualmente, têm recebido maior atenção pela facilidade de produção através de processos fermentativos, pela rapidez de produção, pela facilidade de recuperação do meio de cultivo e pelo fato de, em sua grande maioria, não serem nocivas à saúde humana (CARVALHO *et al.*, 2003; SAXENA *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2005; POLAINA & MACCABE, 2007; MENONCIN *et al.*, 2009). Dentre os fungos utilizados para a produção de lipases através da fermentação em estado sólido, estão: *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Penicillium* (DOELLE *et al.*, 1992; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2005; POLAINA & MACCABE, 2007).

A fermentação em estado sólido (FES) consiste no crescimento de microrganismos em substratos insolúveis em água, com umidade suficiente para permitir o crescimento e o metabolismo microbiano (DOELLE *et al.*, 1992; SINGHANIA *et al.*, 2009). Os resíduos agroindustriais têm apresentado grande potencial para utilização como matriz sólida na FES, por possuírem baixo custo, pela possibilidade de produção de produtos de alto valor agregado e por apresentarem em sua composição, matéria orgânica passível de consumo pelos microrganismos

(PELIZER *et al.*, 2007). Vários resíduos agroindustriais podem ser utilizados para a produção de lipases como: bagaço de cana-de-açúcar (ELLAIAH *et al.*, 2004b; PELIZER *et al.*, 2007), farelo de soja (MENONCIN *et al.*, 2009), farelo de trigo (MARTINS *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2005), bagaço de maçã (PAGANINI *et al.*, 2005) e sementes de abóbora (AQUINO & DANTAS, 2009). As sementes de abóbora apresentam um grande potencial para a produção de lipase microbiana, por possuírem um elevado teor de lipídeos em sua composição (em torno de 35%).

O sucesso da fermentação em estado sólido depende de fatores tais como: temperatura, pH, umidade do substrato, aeração, concentração do inóculo, tipo do substrato e espécie do microrganismo. Assim, é muito importante avaliar a influência dos parâmetros no processo com a finalidade de obter as melhores condições para maximizar a produção dos compostos de interesse.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar através da metodologia de superfície de resposta a influência da temperatura e da umidade do substrato no processo de obtenção de lipase a partir da fermentação em estado sólido de farinha de sementes de abóbora utilizando o microrganismo *Aspergillus niger*.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Aproveitamento de Resíduos

O processamento adequado de frutas e verduras *in natura* para fabricação de sucos naturais, sucos concentrados, doces em conserva, polpas e extratos, dentre outros, gera resíduos, que são comumente descartados no lixo. O volume dos resíduos agroindustriais tende a aumentar ainda mais devido ao desenvolvimento econômico da sociedade, entretanto pode ter uma finalidade mais benéfica ao homem e ao ambiente. Porém, a exploração futura destes resíduos é limitada, já que o material é geralmente propenso a degradação microbológica (KOBORI & JORGE, 2005). Como o descarte destes rejeitos na natureza provoca um grande acúmulo de matéria orgânica, houve, nos últimos anos, um aumento na tentativa de tornar mais eficiente a utilização desses resíduos, a fim de reduzir os problemas de poluição ambiental (PELIZER *et al.*, 2007; ABUD & NARAIN, 2009).

Grande parte destes resíduos pode ser reaproveitado para a elaboração de novos produtos como farinhas para incorporação em bolos e biscoitos (ISHIMOTO *et al.*, 2007; ABUD & NARAIN, 2009), elaboração de geléias (DAMIANI *et al.*, 2008), elaboração de rações para animais (LOUSADA JÚNIOR *et al.*, 2006) ou para obtenção de produtos de alto valor agregado como enzimas, proteínas, ácidos e compostos de aromas (FERRARI *et al.*, 2004; VENDRUSCOLO *et al.*, 2009; NOVAKI *et al.*, 2010).

O aproveitamento de resíduos no processamento de novos produtos alimentícios tem representado um segmento importante para as indústrias, principalmente no que diz respeito à demanda por produtos para dietas especiais, já que tais resíduos possuem nutrientes capazes de suprir a carência de parcelas da população. Esses resíduos são constituídos basicamente de matéria orgânica: fibra, vitaminas, minerais, compostos fenólicos com alto valor nutritivo, abundante e de baixo custo econômico, e que podem ser conservados por longos períodos de tempo através da secagem (LOUSADA JUNIOR *et al.*, 2006; SANTANA & SILVA, 2008; ABUD & NARAIN, 2009).

Os resíduos agroindustriais comumente utilizados para a obtenção de novos produtos são: farelo de trigo (MAHADIK *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2005); farelo de soja (NOVAKI *et al.*, 2010; MENONCIN *et al.*, 2009); casca de arroz (ELLIAH *et al.*, 2004); bagaço de cana-de-açúcar (CORDOVA *et al.*, 1998;

MARTINS *et al.*, 2002; ELLAIAH *et al.*, 2004; PANDEY *et al.*, 2000b; PELIZER *et al.*, 2007); óleo de sementes de tomate, laranja, maracujá e goiaba (KOBORI & JORGE, 2005); casca de coco verde (COELHO *et al.*, 2001; PINHEIRO *et al.*, 2005); casca de maracujá (ISHIMOTO *et al.*, 2007); óleo de sementes de maracujá (FERRARI *et al.*, 2004); resíduo de banana (NETO *et al.*, 1998); resíduo de abacaxi, maracujá, goiaba e melão (LOUSADA JÚNIOR *et al.*, 2006); bagaço do pedúnculo do caju (CAMPOS *et al.*, 2005); bagaço de laranja (MARTINS *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2005); bagaço de maçã (PAGANINI *et al.*, 2005; VENDRUSCOLO *et al.*, 2009).

Em trabalhos prévios realizados no LMA (Laboratório de Microbiologia de Alimentos) da Universidade Federal de Sergipe, verificou-se que a semente de abóbora (*Curcubita moschata*), por apresentar um alto teor de lipídios (em torno de 35%), possui um bom potencial para a obtenção de lipase microbiana (AQUINO & DANTAS, 2009). Applequist *et al.* (2006) e Borges *et al.* (2006) realizaram a caracterização físico-química de sementes de abóbora, e encontraram um teor médio de lipídios de respectivamente: 33% e 36%.

2.1.1- Sementes de Abóbora

As abóboras pertencem à família das Curcubitaceae e são classificadas de acordo com a forma e a textura de seus caules em *Curcubita pepo*, *Curcubita máxima*, *Curcubita mixta* e *Curcubita moschata*. As sementes de plantas da família Curcubitaceae produzem um grande número de proteínas, peptídeos e lipídeos. Recentemente, a abóbora (*Curcubita moschata*) têm recebido bastante atenção devido às propriedades nutricionais de suas sementes e por auxiliar na prevenção de doenças. Em alguns países as sementes de abóbora são utilizadas como ingredientes em pães, bolos, saladas e, após serem tostadas e salgadas, são usadas diretamente na alimentação humana como aperitivos. A farinha de sementes de abóbora também tem sido utilizada em muitos alimentos, como fonte suplementar de proteínas (EL-ADAWY & TAHA, 2001; QUANHONG & CAILI, 2005; XANTHOPOULOU *et al.*, 2009).

As sementes de abóbora apresentam em sua composição os seguintes ácidos graxos: palmítico, esteárico, oléico e linoléico. Dentre eles, o ácido linoléico está presente em maior proporção, e por ser um ácido graxo poliinsaturado, classifica o óleo destas sementes como benéfico à saúde (APPLEQUIST *et al.*, 2006; BELMIRO *et al.*,

2010). O óleo de sementes de abóbora tem sido produzido em partes do sul da Áustria, Hungria e Eslovênia e é utilizado no preparo de alimentos em alguns países da África Ocidental e do Oriente Médio (EL-ADAWY & TAHA, 2001; XANTHOPOULOU *et al.*, 2009). Dentre os benefícios à saúde do óleo de sementes de abóbora estão: atividade contra a hiperlâpsia benigna da próstata; redução da pressão uretral e na bexiga; redução da formação de cristais no corpo; prevenção do câncer de pulmão, mama e estômago; ação vermífuga (APPLEQUIST *et al.*, 2006; XANTHOPOULOU *et al.*, 2009).

Não há registros na literatura consultada de utilização da farinha de sementes de abóbora como substrato em processos de fermentação em estado sólido ou submersa.

2.2 - Fermentação em Estado Sólido (FES)

A fermentação em estado sólido é um processo microbiológico que ocorre, em grande parte, na superfície de materiais sólidos com capacidade de absorver ou conter água, com ou sem sólidos solúveis (ROUSSOS *et al.*, 1991; TOCA-HERRERA *et al.*, 2007) (Figura 1).



Figura 1: Crescimento de *Aspergillus niger* em casca de maracujá (disponível : http://www.eq.ufrj.br/biose/nukleo/aulas/Valorizacao/Valor%20Res%20Agroind_aula%2003.pdf)

A FES tem sido um método bastante utilizado devido a sua simplicidade, por requerer um menor volume quando comparada com a fermentação submersa, além de não requerer equipamentos complexos, e principalmente, devido a uma redução nos custos de produção de compostos interessantes para a indústria como um todo (enzimas, aromas, proteína unicelular, etc), pois pode ser realizada com resíduos agroindustriais (MAHADIK *et al.*, 2002).

Para uma otimização do processo da fermentação em estado sólido, alguns fatores devem ser monitorados de modo a alcançar a produtividade máxima dos compostos de interesse. Dentre estes fatores estão: a temperatura, o pH, a aeração, o tamanho das partículas, a umidade, a atividade de água, fontes de nutrientes (geralmente o carbono e o nitrogênio), a agitação, espessura do material a fermentar e a quantidade do inóculo (PANDEY *et al.*, 2000a; ELLAIAH *et al.*, 2004b; SHI *et al.*, 2009).

Dentre os parâmetros a serem controlados, a umidade do substrato merece especial atenção. Substratos com elevado teor de umidade tornam o meio mais compacto, dificultando a porosidade e, conseqüentemente, reduzindo as trocas gasosas. Além disso, as partículas do substrato ficam grudadas nas paredes do reator e há maior possibilidade de contaminação por bactérias. Baixos teores de umidade, no entanto, reduzem o crescimento microbiano, as trocas metabólicas e a produção de metabólitos. Geralmente nos processos de FES a umidade varia entre 30% e 85%, dependendo do tipo de substrato e da sua capacidade em reter água (DOELLE *et al.*, 1992; SINGHANIA *et al.*, 2009).

O controle da temperatura do processo é outro fator importante na FES. À medida que os microrganismos crescem, durante a fermentação, ocorre a liberação de calor devido às atividades metabólicas. Além disso, as características térmicas do substrato e o baixo teor de umidade dificultam a transferência do calor, e com isso há uma significativa elevação da temperatura do meio. Este incremento de temperatura deve ser controlado de modo a não prejudicar o crescimento microbiano e nem a formação dos produtos. O controle de temperatura pode ser realizado através da passagem de ar pelo meio de cultivo (DOELLE *et al.*, 1992; PANDEY, 2003; SINGHANIA *et al.*, 2009).

O tamanho das partículas do substrato sólido é um fator crítico e varia de acordo com o tipo de resíduo a ser utilizado e com as condições da fermentação. A granulometria das partículas, quando muito pequena, propicia uma maior superfície de

contato e, conseqüentemente, um aumento na bioconversão, porém dificulta a circulação do ar através das partículas, como também dificulta a eliminação de gases e do calor gerado durante o processo fermentativo (DOELLE *et al.*, 1992; COUTO & SANROMÁN, 2006; TOCA-HERRERA *et al.*, 2007).

Muitas bactérias, fungos e leveduras são capazes de crescer em meio sólido, encontrando aplicações em processos fermentativos. O crescimento dos microrganismos na SSF é facilitado pelas condições do meio, que são semelhantes ao de seu habitat natural. Entretanto, a escolha do microrganismo vai depender do tipo de resíduo e do tipo de produto que se deseja obter através da FES (DOELLE *et al.*, 1992; HÖLKER *et al.*, 2004; TOCA-HERRERA *et al.*, 2007).

Os fungos filamentosos são o grupo mais importante de microrganismos para a FES devido as suas capacidades fisiológicas e ao modo de crescimento das hifas. Dentre as capacidades fisiológicas estão o crescimento em baixa atividade de água e em baixo pH, a produção de enzimas extracelulares e a esporulação. A esporulação é bastante vantajosa porque os esporos podem ser facilmente estocados e o inóculo é simples de preparar. O modo de crescimento das hifas dá aos fungos filamentosos maior vantagem sobre os microrganismos unicelulares na colonização de substratos sólidos e na utilização de nutrientes disponíveis. O modo básico de crescimento de fungos filamentosos é a combinação da extensão apical das hifas com a formação de novas hifas, através do brotamento, o que possibilita uma rápida colonização do meio. A rigidez da parede celular entre o topo da hifa e o brotamento do micélio assegura uma ancoragem firme, permitindo que a ponta da hifa transforme a sua pressão de turgor em uma frente de alta pressão mecânica. Além disso, a penetração no substrato é potencializada pela produção de enzimas hidrolíticas. Isso significa que as hifas estão constantemente crescendo em busca de meio fresco, com aproximadamente a mesma composição de um meio não colonizado. Entretanto, a facilidade de colonização dos fungos filamentosos, que varia entre as espécies, depende não apenas da morfologia das hifas, mas também da facilidade de difusão de nutrientes para as hifas em crescimento (DOELLE *et al.*, 1992).

O fungo *Aspergillus niger* é um microrganismo muito utilizado para a produção de enzimas, como as lacases, as pectinases e as lipases, que podem ser utilizadas na indústria alimentícia, pelo fato de em sua grande maioria, não serem nocivas à saúde humana (COELHO *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2005; ALCÂNTARA *et al.*, 2007;

AQUINO *et al.*, 2008). O termo *Aspergillus* significa, em latim, globo perfurado que possui uma esponja ou pincel usado para aspergir água benta. O termo *niger* significa, também em latim, a coloração negra característica do *Aspergillus niger*. Devido à inexistência ou à não evidencição do ciclo sexual, o fungo *Aspergillus niger* é classificado como deuteromiceto. São abundantes no solo e capazes de crescer em uma grande variedade de substratos orgânicos. Quando maduros, apresentam-se na forma de conídios pretos globosos, de aspecto rugoso com equinulações descontínuas, sendo evidenciada duas séries de esterigmas, medindo aproximadamente 5 µm de diâmetro (DOELLE *et al.*, 1992; BEUX & SOCCOL, 2004).

A quantidade de esporos/g ou esporos/mL utilizada na FES também é um importante ponto a ser considerado. Quando a quantidade é muito grande pode haver a inibição do crescimento. Quando é muito pequena há a dificuldade de colonizar todo o substrato. Contudo, a quantidade ótima difere para cada aplicação, e, portanto, precisa ser estudada. Além disso, deve-se evitar o uso de esporos estocados por um longo período de tempo, uma vez que germinam mais vagorosamente e aumentam as chances de contaminação do meio (DOELLE *et al.*, 1992).

2.3 - Lipases Microbianas

As enzimas são proteínas globulares solúveis sintetizadas pelos organismos vivos com a finalidade específica de catalisar as reações bioquímicas, que de outro modo, não ocorreriam sob as condições fisiológicas habituais (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

Dentre os preparados enzimáticos comerciais, a maioria é obtida a partir de microrganismos, devido aos seguintes fatores (ROUSSOS *et al.*, 1991; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; Bon *et al.*, 2008):

- Os microrganismos possuem um alto índice de crescimento e de produção de enzimas;
- Pelo menos teoricamente, é possível encontrar um microrganismo produtor de cada enzima;
- Possibilidade de utilizar matérias-primas baratas, geralmente resíduos agroindustriais.

- Como a maioria das enzimas produzidas por microrganismos é extracelular, há uma maior facilidade de recuperação;
- É possível alterar o código genético dos microrganismos, de modo a propiciar maior produção de determinada enzima.

Dois fatores são necessários para o sucesso da produção comercial de enzimas: a maximização da atividade do microrganismo e a minimização dos custos com substrato e com incubação, bem como os procedimentos de recuperação (BON *et al.*, 2008).

Dentre as enzimas de grande interesse industrial estão as lipases (triglicerol acil-hidrolases, E.C. 3.1.1.3) (Figura 2), definidas como hidrolases de ésteres contendo ácidos graxos de cadeia longa, saturados ou insaturados, com dez ou mais átomos de carbono, que atuam sobre as ligações ésteres de tri, di e monoacilgliceróis (GUTARRA *et al.*, 2009).

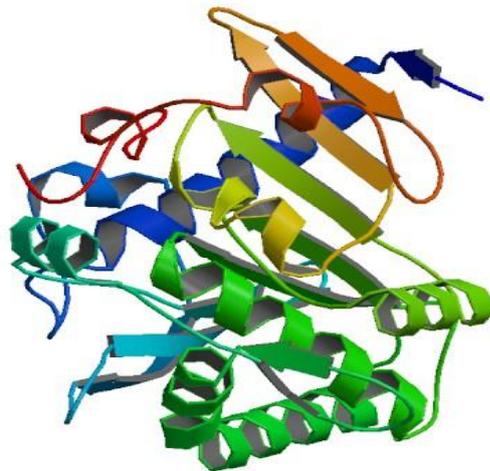


Figura 2: Estrutura molecular de lipase de origem fúngica (disponível: <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3TGL>, acesso : 10/01/11).

As lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa, atividade em pH na faixa entre 3 a 9 (não havendo relatos na literatura de lipase ativa abaixo de pH 2) e em temperaturas variando desde a ambiente até 70 °C (CASTRO *et al.*, 2004; DALLA-VECHIA *et al.*, 2004; PADILHA *et al.*, 2009). Lipases são usualmente

estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30°C e 40°C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (CASTRO *et al.*, 2004; PADILHA *et al.*, 2009).

As lipases podem ser produzidas por plantas, animais e microrganismos. Geralmente, as comerciais são obtidas de uma variedade de microrganismos que as produzem intra ou extracelularmente através de processos fermentativos. Dentre os microrganismos utilizados estão as bactérias do gênero *Bacillus* (KUMAR *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2010), *Staphylococcus* (HORCHANI *et al.*, 2009), *Pseudomonas* (JI *et al.*, 2010), *Lactobacillus* (LOPES *et al.*, 2002) e leveduras do gênero *Candida* (DALMAU *et al.*, 2000; CIAFARDINI *et al.*, 2006; CRUZ *et al.*, 2009), *Saccharomyces* (CIAFARDINI *et al.*, 2006), *Rhodotorula* (HATZINIKOLAU *et al.*, 1999). Entretanto, a maioria das lipases são produzidas por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* (KAMINI *et al.*, 1998; GULATI *et al.*, 2000; MAHADIK *et al.*, 2002; SAXENA *et al.*, 2003; ELLAIAH *et al.*, 2004a; MHETRAS *et al.*, 2009), *Mucor* (ABBAS *et al.*, 2002; MOHAMED *et al.*, 2010), *Rhizopus* (CORDOVA *et al.*, 1998; UL-HAQ *et al.*, 2002; PASTORE *et al.*, 2003; MACEDO *et al.*, 2004; RODRIGUEZ *et al.*, 2006; RAJENDRAN & THANGAVELU, 2009), *Penicillium* (GOMBERT *et al.*, 1999; GUTARRA *et al.*, 2009), *Geotrichum* (BURKERT *et al.*, 2004) e *Rhizomucor* (CORDOVA *et al.*, 1998).

Essas enzimas constituem o mais importante grupo de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas, principalmente, pela versatilidade de suas propriedades e fácil produção de massa. As reações de hidrólise, interesterificação e sínteses de ésteres por lipases estão entre os processos mais promissores para a modificação de lipídeos. As reações de hidrólise envolvem o ataque na ligação éster do triglicerídeo na presença de moléculas de água para produzir glicerol e ácidos graxos (COELHO *et al.*, 2001). A reação de esterificação entre álcoois polihídricos e ácidos graxos livres é a reação inversa da hidrólise do glicerídeo correspondente. Exemplos de produtos químicos de alto valor, obtidos pelo uso de lipases para a esterificação, incluem a síntese de ésteres de ácido oléico com álcoois alifáticos primários e secundários e álcoois terpênicos e a produção de ésteres dos álcoois geraniol e mentol com ácido butírico e ácido láurico, respectivamente. A interesterificação refere-se à troca de radicais acil entre um éster e

um ácido (acidólise), um éster e um álcool (alcoólise) ou um éster e outro éster (transesterificação). Essas reações resultam em um rearranjo dos grupos de ácidos graxos de triglicerídeo, os quais produzem novos triglicerídeos. O rearranjo é resultado de reações concorrentes de hidrólise e esterificação (PAQUES & MACEDO, 2006). A Figura 3, abaixo, esquematiza as reações que podem ser catalisadas por lipases.

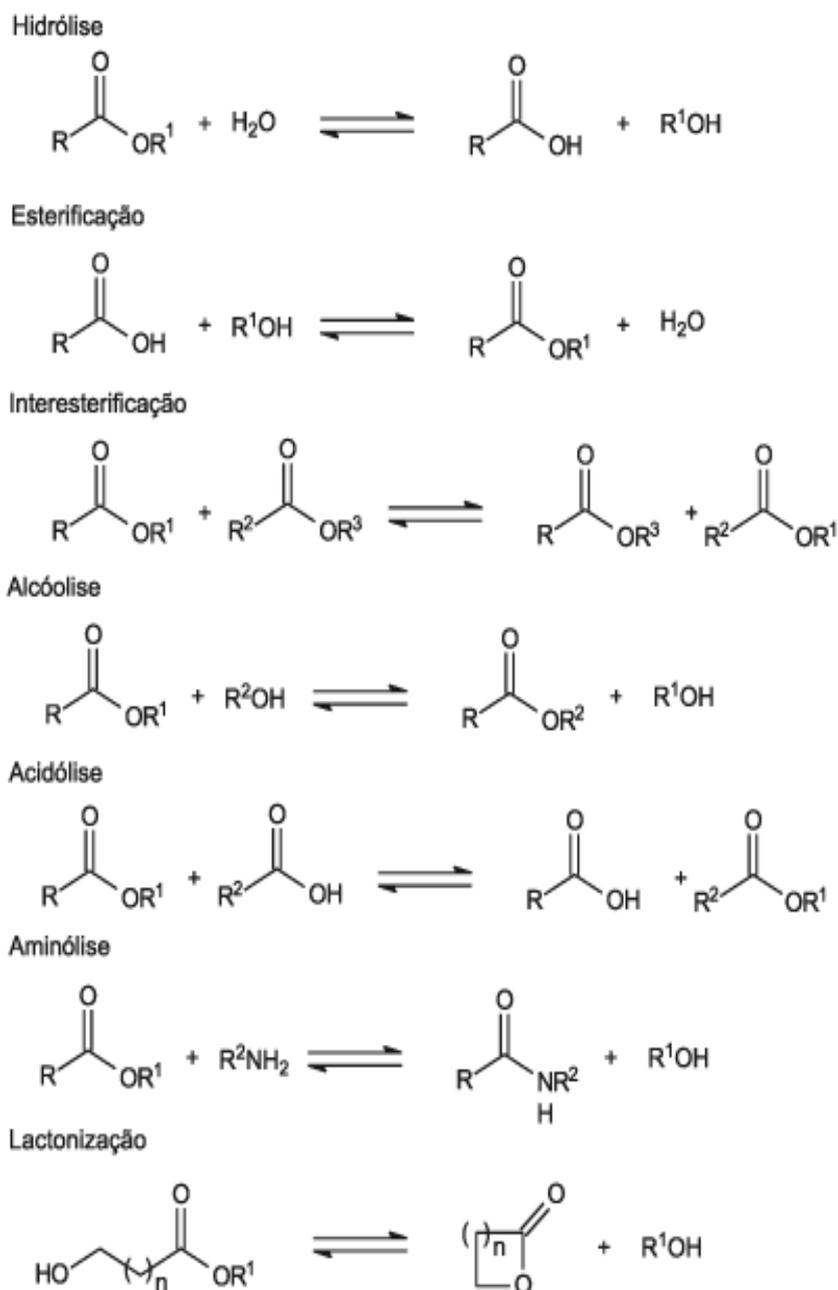


Figura 3: Representação esquemática das reações catalisadas por lipases (PAQUES & MACEDO, 2006).

As lipases apresentam algumas vantagens importantes sobre os catalisadores clássicos, como a especificidade, a regioseletividade e a enantioseletividade, que permitem a catálise de reações em condições brandas de temperatura e pressão (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998; ELLAIAH *et al.*, 2004; GUPTA *et al.*, 2008; RAJENDRAN & THANGAVELU, 2009). Como desvantagens, as enzimas ainda apresentam importantes limitações tecnológicas, como o custo e a exigência de tempos de reação considerados proibitivos para um processo industrial (NOUREDDINI *et al.*, 2005; KNEZEVIC *et al.*, 2006). Essas enzimas são diversificadas nas suas propriedades enzimáticas e sua especificidade a substratos tornando-se muito atrativas para aplicações industriais na obtenção de vários produtos tais como: alimentos, detergentes, produtos farmacêuticos, cosméticos, produtos têxteis, entre outros (HASSAN *et al.*, 2006). A Tabela 1 mostra algumas das aplicações industriais da lipase.

Quanto à especificidade com relação ao substrato, as lipases são divididas em três grupos: lipases não-específicas - catalisam a hidrólise de triacilgliceróis para ácidos graxos livres e glicerol, de modo aleatório; lipases 1,3-específicas – catalisam a liberação de ácidos graxos especificamente das posições *sn*-1 e *sn*-3 dos acilgliceróis; lipases ácido graxo específicas - catalisam a hidrólise de tipos específicos de grupos acilas nas moléculas de triacilgliceróis (CARVALHO *et al.*, 2003).

O mercado mundial de enzimas industriais, de acordo com um relatório técnico de pesquisa de mercado da BCC Research em 2007, atingiu cerca de US\$ 2,3 bilhões. Espera-se que em 2012, este valor seja superior a US\$ 2,7 bilhões, a uma taxa de crescimento médio anual de 4%. O mercado encontra-se dividido em 3 segmentos: aplicações técnicas, alimentos e enzimas para alimentação animal. As enzimas para aplicações técnicas detêm mais de 50% do mercado, avaliado em cerca de US\$ 1,1 bilhão em 2007, espera-se que este segmento em 2012, chegue a valer cerca de US\$ 1,4 bilhões a uma taxa de crescimento anual de 3,5%. O segundo maior segmento é o de enzimas para alimentos, o qual obteve em 2007 valor estimado de US\$ 830 milhões e atingirá US\$ 1,0 bilhão até 2012, representando um crescimento anual de 4%. O segmento de enzimas para alimentação animal chegou a valer em 2007 US\$ 280 milhões e acredita-se que em 2012 valerá US\$ 375 milhões, o que representa um crescimento anual de 4%. Devido às questões ambientais e aos custos com processos químicos convencionais, a produção de enzimas através de processos biotecnológicos

tem sido cada vez mais crescente, pois oferece diversas vantagens sobre as tecnologias convencionais (BCC, 2008).

Tabela 1 – Algumas aplicações industriais da lipase.

Indústria	Aplicação
Têxtil	Remoção de gordura da matéria prima; Melhoramento dos fios e tecidos.
Detergentes	Melhora a detergência; Reduz o impacto ambiental de produtos detergentes.
Aromas	Síntese de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta e alcoóis.
Produção de polímeros biodegradáveis	Síntese orgânica e produção de poliésteres biodegradáveis.
Óleos e gorduras	Produção de ácidos graxos de interesse em óleos e gorduras, através da transesterificação.
Farmacêutica	Produção de enantiômeros únicos de intermediários de drogas.
Cervejaria	Melhoramento do aroma; Redução do tempo de fermentação.
Panificação	Aumento do prazo de validade; Melhora e controla o escurecimento não-enzimático; Aumenta o volume do pão e melhora a estrutura do miolo.
Médica	Servem como ferramentas de diagnóstico.
Laticínios	Hidrólise da gordura do leite; Aprimoramento do aroma e da qualidade.
Tratamento de resíduos	Decomposição de lipídios de efluentes.
Cosméticos	Aumento da qualidade dos produtos.
Papel	Aumento da branquidão do papel; Redução no uso de produtos químicos.
Processamento de carnes	Redução no conteúdo de gorduras.

Fonte: Hassan *et al.* (2006).

2.4 – Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

O desenvolvimento de produtos e processos deve-se basear em princípios que reduzam os custos operacionais e otimizem os processos. O termo otimizar significa

descobrir condições que se apliquem a determinado procedimento e que produzam a melhor resposta possível. O procedimento da tentativa e erro foi, por muitos anos, uma ferramenta bastante comum na análise e quantificação das variáveis de estudo. Entretanto, é praticamente impossível analisar todos os fatores que possam influenciar o processo e a interação entre eles, uma vez que nessa metodologia os fatores são avaliados um por vez. Devido à alta competitividade, não há no mercado, espaço para processos de otimização demorados, com elevado custo e pouco confiáveis do ponto de vista estatístico. Por este motivo, o planejamento de experimentos é indispensável para que resultados confiáveis sejam obtidos e para que análises estatísticas consistentes possam ser realizadas, além de reduzir os custos e a perda de tempo (LEE & CHEN, 1997; FRANCIS *et al.*, 2003; RODRIGUES & IEMMA, 2005; DOBREV *et al.*, 2007; LOTFY *et al.*, 2007; BEZERRA *et al.*, 2008; TENG & XU, 2008; RAJENDRAN & THANGAVELU, 2009; AÇIKEL *et al.*, 2010).

A metodologia de superfície de resposta foi desenvolvida por Box e colaboradores nos anos 50, e consiste em um conjunto de técnicas estatísticas e matemáticas baseadas em modelos empíricos, utilizadas para desenvolver, melhorar e otimizar processos. A partir dessas técnicas, funções lineares ou polinomiais são empregadas para descrever o sistema estudado, explorando todas as condições experimentais até chegar à otimização (RODRIGUES & IEMMA, 2005; LOTFY *et al.*, 2007; BEZERRA *et al.*, 2008; LAKSHMI *et al.*, 2009; SHARMA *et al.*, 2009; AÇIKEL *et al.*, 2010).

A aplicação da metodologia de superfície de resposta no desenvolvimento dos processos possui as seguintes finalidades (RODRIGUES & IEMMA, 2005):

- 1- Redução do número de experimentos ou repetições e melhora da qualidade da informação obtida através dos resultados. Desta maneira, há uma considerável redução do trabalho e, conseqüentemente, de tempo e do custo final;
- 2- Avaliação simultânea de todos os parâmetros envolvidos, assim como da interação entre eles. Isto possibilita verificar e quantificar efeitos sinérgicos e antagônicos entre os fatores de interesse;
- 3- Possibilidade de calcular e avaliar o erro experimental, especificando o nível de confiança estatística com o qual se pode estimar a reprodutibilidade do resultado desejado;

4- Possibilidade de avaliar mais de uma resposta ao mesmo tempo.

A otimização das condições da fermentação é de grande importância no desenvolvimento de qualquer processo fermentativo devido ao seu impacto na economia, pela redução dos custos e pela formação de produtos de alto valor agregado (como é o caso das lipases), e à praticidade do processo. Devido à diversidade das interações físicas e químicas no processo fermentativo, não há um procedimento de otimização padrão, sendo necessário para cada caso, a realização de estudos que levem à otimização do processo. Experimentos estatísticos têm sido muito utilizados e podem ser empregados em várias fases do processo de otimização. A otimização dos processos fermentativos através de experimentos estatisticamente planejados é um processo seqüencial. Primeiramente, há a seleção de um grande número de variáveis e aquelas que forem insignificantes serão eliminadas. As variáveis remanescentes serão, então, otimizadas através da metodologia de superfície de resposta (FRANCIS *et al.*, 2003; LOTFY *et al.*, 2007; BEZERRA *et al.*, 2008; TENG & XU, 2008; LAKSHMI *et al.*, 2009; RAJENDRAN & THANGAVELU, 2009; AÇIKEL *et al.*, 2010). Os parâmetros mais comumente descritos na literatura para o desenvolvimento de processos fermentativos e a otimização da produção de lipases são: pH do meio, temperatura de incubação, agitação, mistura de substratos e adição de nutrientes (WOLSKI *et al.*, 2009).

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Matéria-prima

As sementes de abóbora da espécie *Curcubita moschata* foram adquiridas em feiras livres da cidade de Aracaju-SE. Todos os reagentes foram de grau analítico.

3.2 – Microrganismo

O microrganismo *Aspergillus niger* IOC 3677 foi adquirido da coleção de culturas do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil), preservado em tubos com ágar nutriente inclinado e estocados a 4°C, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LMA) da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

3.3 - Metodologia Experimental

3.3.1 – Preparo da farinha de sementes de abóbora

As sementes de abóboras foram secas em secador, Pardal – PE 100, à temperatura de 60 °C por 8 horas, em seguida, trituradas em moinho tipo Wiley, com diâmetro médio de 1,06 mm, esterilizadas em autoclave à 121°C durante 15 minutos e armazenadas em frascos de vidro estéreis até a utilização (BORGES *et al.*, 2006). As sementes e a farinha obtidos estão demonstradas na Figura 4.



(a)



(b)

Figura 4: Sementes de abóbora (a); Farinha de sementes de abóbora (b).

3.3.2 - Caracterização físico-química da farinha das sementes de abóbora

A farinha de semente de abóbora foi caracterizada quanto à composição físico-química. As análises realizadas foram: umidade, proteínas, lipídios, cinzas, acidez e pH. Todas as análises foram executadas em triplicata, de acordo com metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2005).

Umidade

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico, por secagem em estufa com circulação forçada de ar, a 105 °C, por 2 horas até peso constante.

Proteínas

A determinação do conteúdo de proteína foi realizada pela técnica de Kjeldahl, sendo o teor protéico calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator 6,25.

Lipídios

O teor de lipídios foi realizado por extração com solvente a quente (Soxhlet) utilizando o éter etílico.

Cinzas

O teor de cinzas foi determinado pelo processo gravimétrico, através da carbonização das amostras, seguida de incineração em mufla a 550°C até massa constante e resfriamento em dessecador.

Acidez

A acidez total foi determinada por meio de titulação com NaOH 0,1N, utilizando-se fenolftaleína (1%, p/v) como indicador. Os resultados foram expressos em g/100g de acidez em ácido oléico.

pH

As leituras dos valores de pH foram realizadas no sobrenadante obtido a partir da homogeneização de 10 g da amostra em 100 mL de água, filtrado em gaze. Utilizou-se um potenciômetro da marca alphakit at-300.

3.3.3. Produção de lipase microbiana a partir de resíduos de sementes de abóbora

Para a avaliação da produção de lipase microbiana a partir de resíduos de sementes de abóbora, foi adotada a metodologia do planejamento experimental empregando a matriz de 2^2 com 4 repetições no ponto central e 4 pontos axiais. A atividade hidrolítica foi avaliada em função da temperatura (X_1) e da umidade (X_2), conforme a matriz apresentada na Tabela 2.

As fermentações foram conduzidas em placas de petri contendo 10 g de farinha de sementes de abóbora. O inóculo consistiu da adição de esporos do *Aspergillus niger* em água destilada estéril até que a suspensão atingisse a concentração de aproximadamente 10^6 esporos/mL (Figura 5). Diferentes volumes da suspensão de esporos foram adicionados às placas de petri contendo 10g da farinha de sementes de abóbora, a depender do teor de umidade desejado. A cada 24 horas retirou-se uma placa de petri para a determinação da atividade hidrolítica. A faixa de umidade e de temperatura escolhida neste trabalho foi baseada em trabalhos anteriores (AQUINO & DANTAS, 2009).

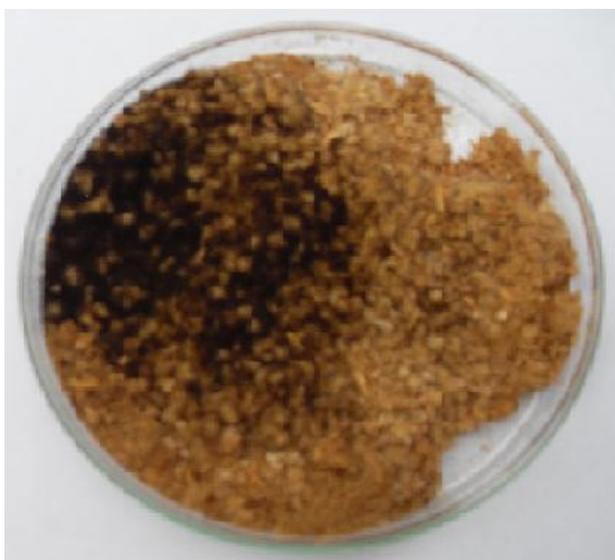


Figura 5: FES da farinha de sementes de abóbora utilizando *Aspergillus niger*.

Tabela 2- Matriz do delineamento composto central rotacional empregado no estudo da produção de lipase por FES.

Experimentos	Níveis Codificados		Valores Reais das Variáveis	
	X ₁	X ₂	Temperatura (°C)	Umidade (%)
1	-1	-1	30	30
2	+1	-1	40	30
3	-1	+1	30	60
4	+1	+1	40	60
5	-1,41	0	28	45
6	+1,41	0	42	45
7	0	-1,41	35	24
8	0	+1,41	35	66
9	0	0	35	45
10	0	0	35	45
11	0	0	35	45
12	0	0	35	45

X₁: Valores codificados para temperatura (°C)

X₂: Valores codificados para umidade (%).

Após a realização do planejamento experimental, selecionou-se a melhor condição, isto é, o experimento em que se obteve a maior atividade hidrolítica. Então, uma triplicata desse experimento foi realizada para a validação.

3.3.4 – Crescimento microbiano

A quantificação indireta do crescimento celular foi realizada através da dosagem da glicosamina, segundo Aidoo *et al.* (1981). Adicionou-se 5 mL de uma solução de ácido clorídrico 6M a 0,5 g de amostra, colocando-se a mistura em banho de água

fervente por 2 horas. Em seguida, a amostra foi resfriada e filtrada a vácuo. Do sobrenadante, transferiu-se 1 mL para um balão de 25 mL, adicionando-se uma gota de solução alcoólica de fenoftaleína 0,5 % (p/v). A neutralização foi efetuada adicionando-se solução de hidróxido de sódio 3N, até que a mistura atingisse a coloração rosa. Procedeu-se então, à titulação reversa com uma solução de KHSO_4 1%, até que a coloração rosa desaparecesse. O volume do balão foi completado com água destilada.

Após a etapa de extração, misturou-se 1 mL da solução à 1 mL de solução de acetil acetona¹ em Na_2CO_3 0,5 N, colocando a mistura em banho de água fervente por 20 minutos. Após o resfriamento das amostras adicionou-se 6 mL de etanol e 1 mL do reagente de Erlich². Os tubos foram então incubados à 65°C por 10 minutos, e a absorbância lida em espectrofotômetro a 530 nm. O branco foi preparado adicionando-se água em substituição a amostra. A determinação da concentração de glicosamina presente no fermentado foi realizada com base em uma curva padrão de glicosamina variando entre 0 a 0,2 g/mL.

3.3.5 – Extração da enzima presente nos fermentados

A extração da enzima foi realizada adicionando-se ao fermentado tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 na proporção 1:5, mantendo-se sob agitação à temperatura de 30 °C durante 15 min. A seguir, centrifugou-se durante 10 min. à 1.000 rpm, obtendo-se o extrato bruto enzimático (adaptada de WOLSKI *et al.*, 2009).

3.3.6 – Determinação da Atividade Hidrolítica

A atividade enzimática do extrato bruto enzimático foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva de acordo com o procedimento descrito por SOARES *et al.* (1999), com algumas modificações. O substrato foi preparado utilizando-se azeite de oliva e goma arábica. Em frascos Erlenmeyeres de 125mL foram adicionados: 5 mL do substrato, 2 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e 1 mL de extrato bruto enzimático. Os Erlenmeyers foram incubados à 37°C por 5 min, em banho termostaticado com agitação. Após este tempo a reação foi paralisada pela mistura de acetona e etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,04 M, utilizando fenoftaleína como indicador.

Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ácido graxo por min. de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em (1U/g de substrato seco=1 μ mol/g de substrato seco.min). Para cada análise de atividade foi realizado um branco (controle) utilizando tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0).

Para a determinação da atividade da enzima produzida durante o processo fermentativo foi utilizada a equação 1 abaixo, conforme metodologia de Pinheiro (2006):

$$\text{Atividade}(U / g \text{ de substrato seco}) = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 10^3 \times V_t}{V_e \times t \times M_s} \quad (\text{Eq.1})$$

Onde:

V_a = volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL);

V_b = volume de KOH gasto na titulação do branco (mL);

V_e = volume da amostra usada na reação (mL);

V_t = volume do tampão usado na extração da enzima (mL);

M = normalidade da solução de KOH;

t = tempo de reação (minutos);

M_s = massa seca do substrato usada na reação (g);

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Caracterização físico-química da farinha de sementes de abóbora

A farinha das sementes de abóbora foi caracterizada quanto aos teores de umidade, proteínas, lipídios, cinzas, acidez e pH. Os resultados obtidos neste trabalho e os da literatura estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Características físico-químicas da farinha de sementes de abóbora.

Parâmetros	Média \pm Desvio	Borges <i>et al.</i> ,	Pumar <i>et al.</i> ,	Belmiro <i>et al.</i> ,
		(2006)	(2008)	(2010)
pH	6,81 \pm 0,00	-	-	6,60
Acidez em ácido oléico (%)	1,25 \pm 0,00	-	-	0,26
Lipídeos (%)	42,97 \pm 0,36	37,22	32,25	-
Proteínas (%)	26,52 \pm 0,07	30,80	26,79	27,32
Cinzas (%)	5,00 \pm 0,00	4,55	4,32	3,95
Umidade (%)	5,84 \pm 0,05	-	8,41	6,29

O teor de proteínas da farinha das sementes de abóbora da espécie *Curcubita moschata* (26,52%) foi inferior ao obtido por Borges *et al.*, (2006) (30,80%) e próximo ao obtido por Belmiro *et al.*, (2010) (27,32%) e Pumar *et al.*, (2008) (26,79%). O teor de cinzas (5,00%) foi próximo ao encontrado por Borges *et al.*, (2006) (4,55%), Belmiro *et al.*, (2010) (3,95%) e Pumar *et al.*, (2008) (4,32%). O pH da farinha foi similar ao obtido por Belmiro *et al.*, (2010), (pH 6,6), entretanto a acidez foi maior do que a obtida pelo autor, cujo valor foi 0,26%. O teor de umidade (5,84%) foi menor do que o determinado por Belmiro *et al.*, (2010) (6,29%) e Pumar *et al.*, (2008) (8,41%). O teor de lipídeos obtido neste trabalho, em torno de 43%, foi maior do que o obtido por Borges *et al.*, (2006) (37%), Pumar *et al.*, (2008) (32%) e Aquino & Dantas (2009) (35%).

As diferenças na composição físico-química da farinha de sementes de abóbora em relação à literatura podem estar associadas a fatores tais como: condições de plantio,

época da colheita, espécie, clima onde foram cultivadas as abóboras, bem como a temperatura utilizada para a secagem das sementes.

Tendo a farinha das sementes de abóbora apresentado teor de lipídeos elevado e uma considerável fonte de nitrogênio foi proposto avaliar o potencial deste resíduo, comumente descartado em lixos, como substrato para a obtenção de lipase microbiana através da fermentação em estado sólido.

4.2 – Cinética de produção de lipase

As fermentações em estado sólido foram realizadas de acordo com o planejamento experimental descrito na tabela 2. A cinética de produção de lipase foi acompanhada ao longo do processo fermentativo com o objetivo de determinar em que tempo foi obtida a máxima atividade hidrolítica.

A tabela 4 mostra a matriz do planejamento experimental com os valores reais das variáveis independentes, os valores codificados e o máximo de resposta obtido para a atividade hidrolítica, em cada ponto experimental.

Foi observado em todas as fermentações que a produção de lipase aumentou ao longo do tempo de fermentação, atingindo um valor máximo seguido de estabilidade ou diminuição como demonstrado nos gráficos das Figuras 6, 7, 8, 9 e 10. Nos experimentos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 obteve-se máxima atividade hidrolítica de 71,88; 26,07; 53,39; 54,37; 46,29; 25,54; 58,67; 70,56; 60,00; 56,27; 57,25 e 64,64 U/ g seca, nos tempos de 120; 24; 264; 216; 96; 96; 240; 264; 96; 120; 144 e 96 horas de fermentação, respectivamente.

A máxima atividade hidrolítica (71,88 U/g seca) foi obtida no experimento 1 quando utilizado resíduo contendo 30% de umidade e temperatura de 30°C em 120 horas de fermentação. A menor produção de lipase (25,54 U/g seca) foi obtida no experimento 6 (45% de umidade e 42 °C de temperatura).

Tabela 4: Níveis codificados e valores reais das variáveis independentes do planejamento fatorial e atividade hidrolítica durante as fermentações.

Atividade Hidrolítica (U/g de substrato seco))																	
Ensaio	Variáveis				Tempo de fermentação (h)												
	X ₁	X ₂	T	U	0	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264	288
1	-1	-1	30	30	12,85	13,7	24,99	39,58	51,43	71,88	54,22	66,42	54,28	51,15	41,42	49,81	28,57
2	+1	-1	40	30	12,85	26,07	18,51	16,84	14,97	12,67	8,23	6,93	22,10	23,86	25,69	24,75	21,97
3	-1	+1	30	60	12,85	26,99	21,96	25,35	29,37	33,98	51,27	23,85	37,90	52,11	42,81	53,39	44,38
4	+1	+1	40	60	12,85	19,76	22,78	21,89	30,94	34,09	34,78	29,09	27,78	54,37	35,14	29,35	38,29
5	-1,41	0	28	45	12,85	10,77	37,10	40,48	46,29	41,77	36,23	37,40	44,15	45,2	42,49	45,79	40,19
6	+1,41	0	42	45	12,85	22,9	14,97	23,14	25,54	21,06	14,56	13,36	7,81	15,01	19,61	21,77	19,93
7	0	-1,41	35	24	12,85	25,68	14,44	16,43	13,48	12,16	18,26	26,78	33,86	52,51	58,67	37,95	41,89
8	0	+1,41	35	66	12,85	30,15	21,17	15,97	23,80	32,24	50,28	30,47	48,68	-	47,34	-	48,47
9	0	0	35	45	12,85	14,83	23,14	37,73	60,00	48,75	46,10	33,28	34,52	30,89	34,73	36,50	38,81
10	0	0	35	45	12,85	11,89	28,96	31,32	53,40	56,27	55,75	46,98	45,87	35,97	42,14	38,52	40,50
11	0	0	35	45	12,85	16,97	22,07	34,00	42,79	46,12	57,25	45,25	48,02	38,63	37,48	29,99	30,02
12	0	0	35	45	12,85	15,18	26,85	37,21	64,64	54,27	51,37	35,35	43,44	32,30	32,24	36,33	33,34

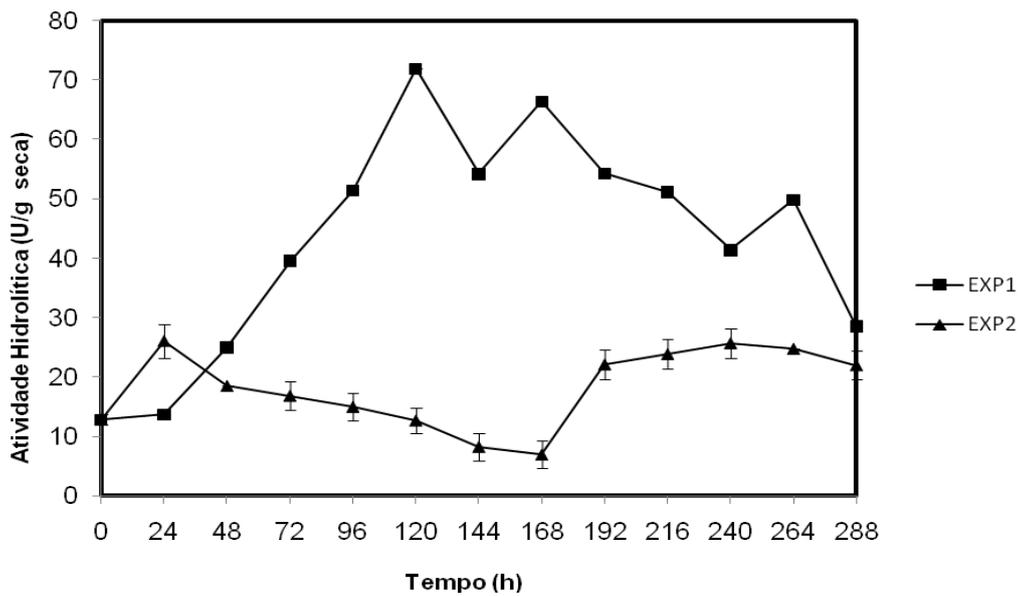


Figura 6: Cinética da fermentação em estado sólido para produção de lipase utilizando temperatura e umidade inicial da farinha, de respectivamente 30°C e 30% (EXP1) e 40°C e 30% (EXP2).

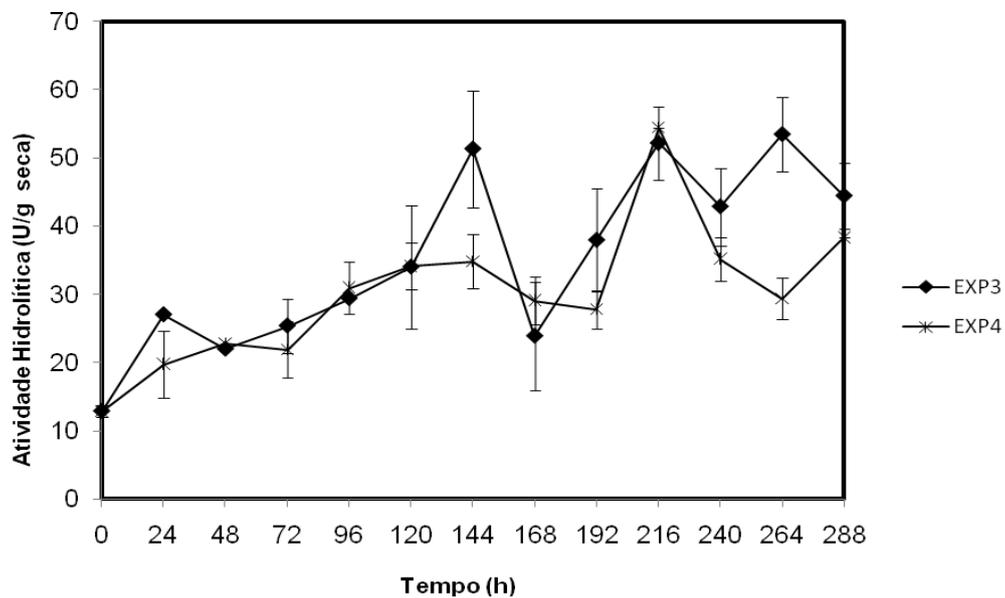


Figura 7: Cinética da fermentação em estado sólido para produção de lipase utilizando temperatura e umidade inicial da farinha, de respectivamente 30°C e 60% (EXP3) e 40°C e 60% (EXP4).

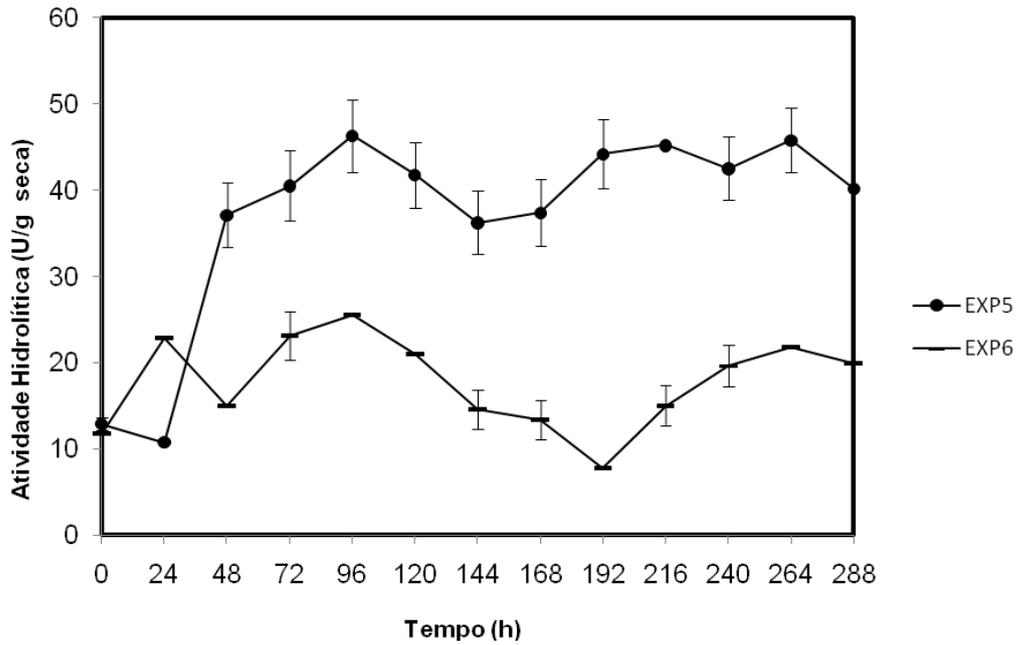


Figura 8: Cinética da fermentação em estado sólido para produção de lipase utilizando temperatura e umidade inicial da farinha, de respectivamente 28°C e 45% (EXP5) e 42°C e 45% (EXP6).

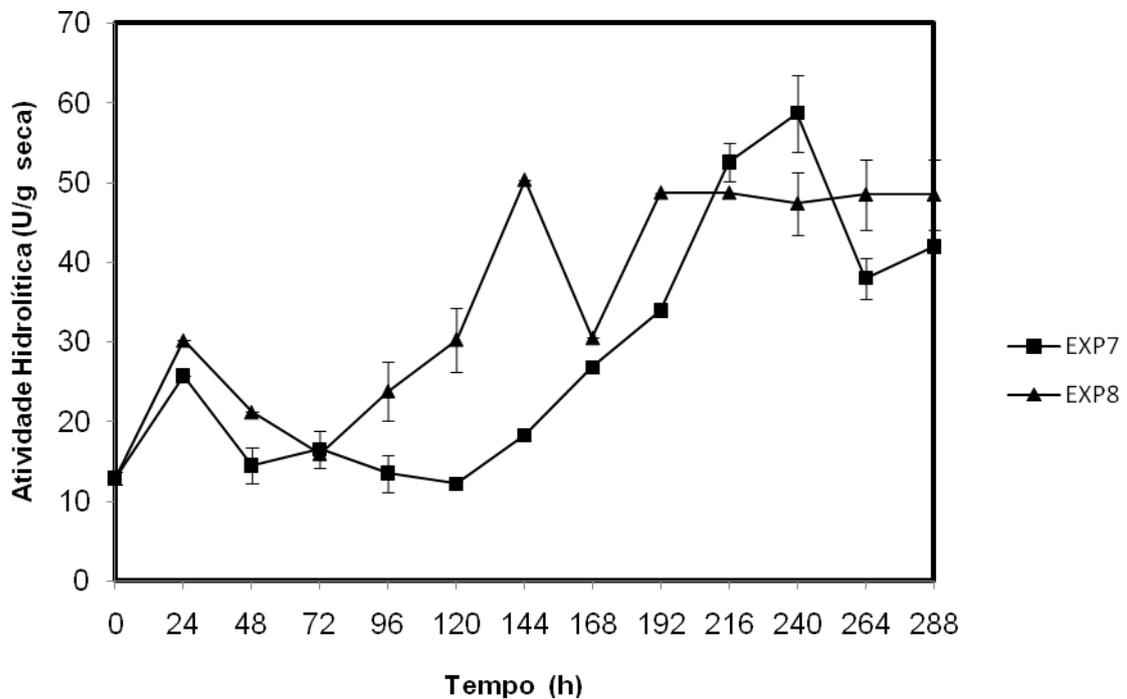


Figura 9: Cinética da fermentação em estado sólido para produção de lipase utilizando temperatura e umidade inicial da farinha, de respectivamente 35°C e 24% (EXP7) e 35°C e 66% (EXP8).

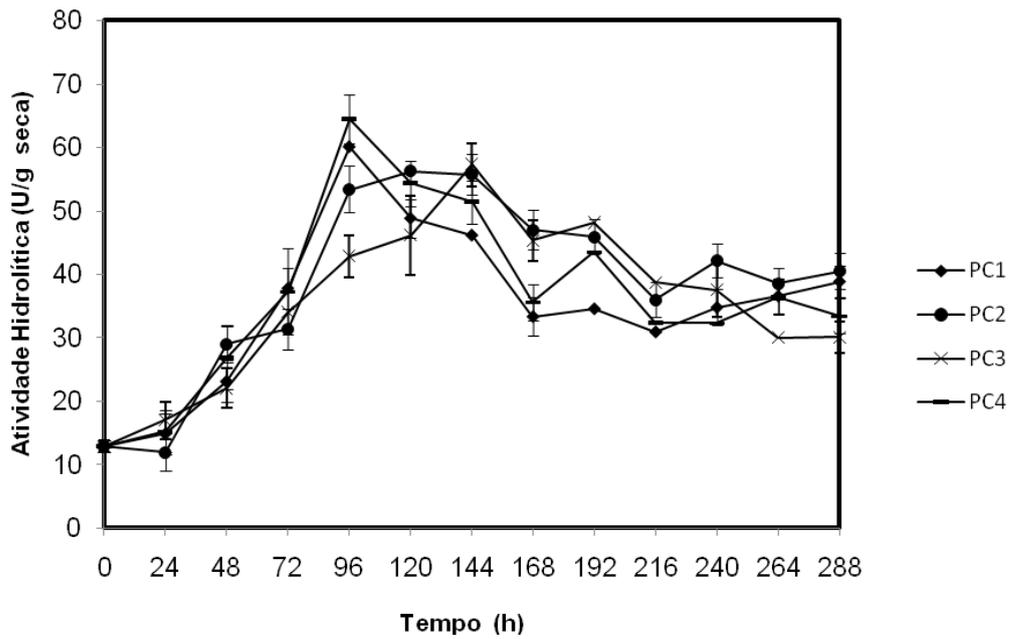


Figura 10: Cinética da fermentação em estado sólido para produção de lipase utilizando temperatura e umidade inicial da farinha, de respectivamente 35°C e 45% (PC1, PC2, PC3 e PC4).

Para efeito de validação, a condição do experimento 1 foi realizada em triplicata, não obtendo diferença significativa entre os resultados obtidos como observado no gráfico da Figura 11.

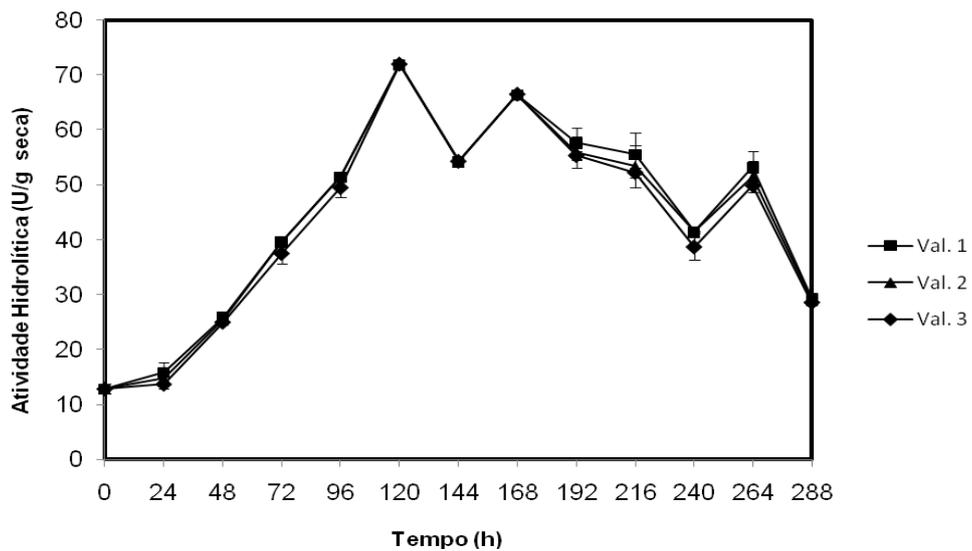


Figura 11: Cinética de produção de lipase do experimento 1 (umidade 30%, temperatura 30°C) realizado em triplicata.

Os resultados obtidos neste trabalho foram maiores do que os encontrados por Kamini *et al.*, (1998) e Colla *et al.* (2010), os quais fermentaram com *Aspergillus* sp torta de amendoim, farelo de arroz e bagaço de cana-de-açúcar; e uma mistura de farelo de soja e casca de arroz obtendo máxima atividade hidrolítica de 10,2, 35,4 e 5,0; e 25,7 U/g seca, respectivamente.

Entretanto, alguns pesquisadores têm obtido atividades hidrolíticas maiores em fermentação em estado sólido de resíduos tais como: Kamini *et al.*, (1998), Mahadik *et al.* (2002) e Edwinoliver *et al.* (2010), os quais obtiveram máxima atividade hidrolítica de 169,0 e 198,3; 340,0; e 521,6 U/g seca após a fermentação de torta de sésamo e farelo de trigo; farelo de trigo; e uma mistura de farelo de soja, torta de coco e trigo, com *Aspergillus niger*, respectivamente.

4.3 - Cinética do Crescimento Microbiano

A quantificação do crescimento celular foi determinada de forma indireta através da concentração de glicosamina, que é um componente da parede celular dos fungos. As fermentações foram realizadas em triplicata apenas na condição do experimento 1 (30% de umidade de substrato e temperatura de fermentação de 30°C) no qual obteve-se maior produção de lipase. Os resultados estão apresentados no gráfico da Figura 12.

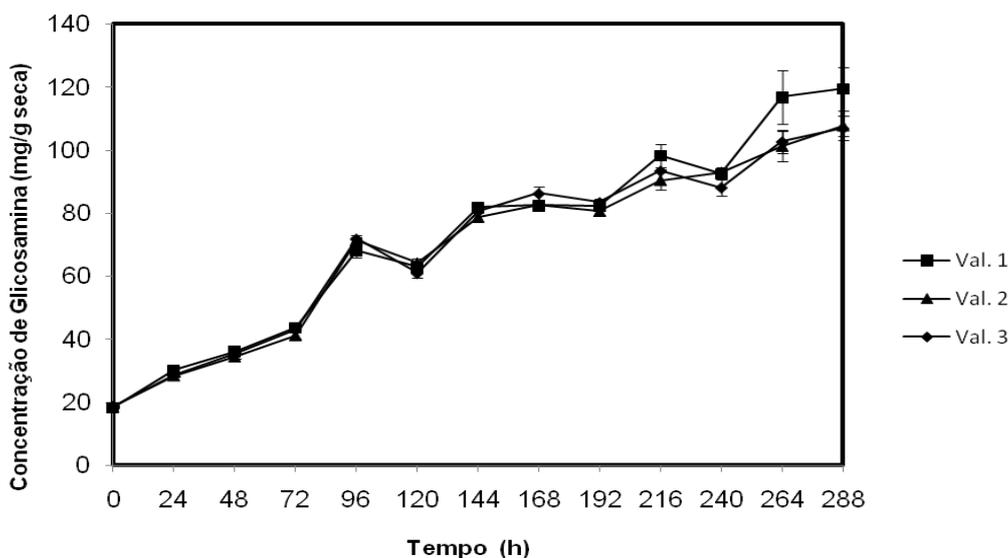


Figura 12: Quantificação indireta do crescimento fúngico através da concentração de glicosamina.

O crescimento microbiano aumentou com o tempo de fermentação atingindo seu valor máximo (123,46 mg/g seca) em 288 horas de fermentação. O aumento do crescimento microbiano não foi proporcional ao aumento da atividade hidrolítica, tendo em vista que o valor máximo de produção de lipase foi obtido em 120 horas de fermentação. Uma hipótese para este fato seria que o elevado crescimento microbiano ocasionou maior produção de proteases em detrimento a de lipases, resultando em diminuição na atividade hidrolítica. Este comportamento também foi observado por Dutra *et al.* (2008).

Os valores obtidos neste trabalho foram bem maiores do que os encontrados por Chou & Rwan (1995), Menezes *et al.*, (2006), Edwinoliver *et al.*, (2010), Kamini *et al.*, (1998), Dutra *et al.*, (2008) e Hamidi-Esfahani *et al.*, (2004), os quais obtiveram crescimento máximo de 21,6 mg/g seca de *Aspergillus oryzae* em Koji preparado com arroz extrusado, 21,54 mg/g seca de *Aspergillus niger* em resíduo de maracujá e farelo de trigo fermentado, 20 mg/g seca de *Aspergillus niger* em uma mistura de farelo de soja, torta de coco e trigo, 5,9 mg/ g seca de *Aspergillus niger* em torta de sésamo, 15 mg/g seca de *Aspergillus niger* em farelo de trigo, 50 mg/g seca de *Aspergillus niger* em farelo de trigo, respectivamente.

Esse resultado demonstrou o potencial da farinha de sementes de abóbora como substrato natural para o crescimento do fungo *Aspergillus niger*.

4.4 - Influência de parâmetros na produção de lipase por fermentação em estado sólido - Análise de superfície de resposta

Nesta etapa do trabalho foi avaliada a influência da temperatura e da umidade inicial do substrato na produção de lipase através da fermentação de sementes de abóbora. Os valores máximos de atividade hidrolítica de todos os experimentos estão representados na tabela 5.

Tabela 5: Matriz do planejamento experimental para a produção de lipase através da FES, com os valores reais, codificados e o máximo de atividade hidrolítica.

Ensaio	X ₁	X ₂	T (°C)	U (%)	Atividade Hidrolítica (U/g)
					Desvio Padrão (±)
1	-1	-1	30	30	71,88 ± 0,00
2	+1	-1	40	30	26,07 ± 2,82
3	-1	+1	30	60	53,39 ± 5,44
4	+1	+1	40	60	54,37 ± 0,00
5	-1,41	0	28	45	46,29 ± 4,22
6	+1,41	0	42	45	25,54 ± 0,00
7	0	-1,41	35	24	58,67 ± 4,83
8	0	+1,41	35	66	50,28 ± 0,00
9	0	0	35	45	60,00 ± 0,00
10	0	0	35	45	56,27 ± 0,00
11	0	0	35	45	57,25 ± 3,40
12	0	0	35	45	64,64 ± 3,85

X₁: Valores codificados para temperatura (°C)

X₂: Valores codificados para umidade (%).

Os dados da tabela 5 foram estatisticamente tratados e a partir daí pôde-se obter o gráfico de Pareto (figura 13), que mostra quais parâmetros foram estatisticamente significativos na produção de lipase, ao nível de 95% de confiança.

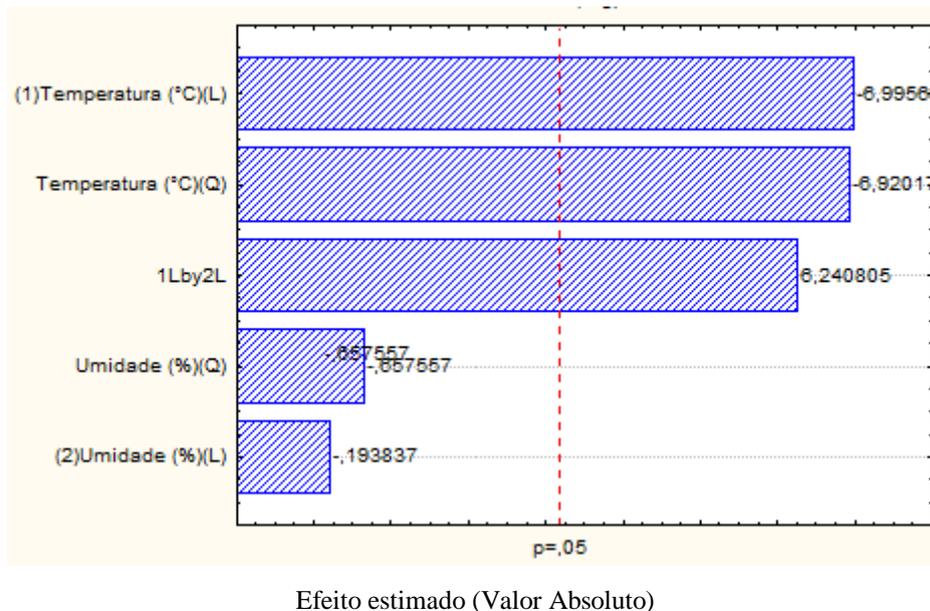


Figura 13: Gráfico de Pareto para a produção de lipases através da FES.

Verificou-se que os parâmetros umidade linear e quadrática não foram estatisticamente significativos para a determinação da atividade hidrolítica, ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), ou seja, não apresentaram efeito sobre a produção de lipase. A variável temperatura (linear e quadrática) foi a que mais interferiu na atividade hidrolítica, entretanto de forma negativa, ou seja, quanto maior a temperatura menor a atividade hidrolítica. A interação umidade e temperatura exerceu efeito positivo sobre a atividade hidrolítica.

Na equação 2 está apresentado o modelo codificado de segunda ordem para a produção de lipase em função da temperatura de fermentação e umidade do substrato, onde T é a temperatura e U é a umidade.

$$\text{Atividade lipásica (U/g seca)} = 59,54 - 9,27.T - 10,25.T^2 + 11,70.T.U \quad (\text{Eq.2})$$

O modelo empírico obtido foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 6. O coeficiente de correlação $R^2 = 0,9018$ e o F calculado (de cerca de 2,5 vezes maior que o F tabelado = 4,39) validaram estatisticamente o modelo e permitiram a construção da superfície de resposta e da curva de contorno representadas nas Figuras 14 e 15.

Tabela 6- Análise de variância para a atividade hidrolítica produzida por FES.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	1916,293	5	383,259	11,03
Resíduo	208,548	6	34,758	-
Falta de ajuste	166,389	3	-	-
Erro puro	42,159	3	-	-
Total	2124,841	11	-	-

Coeficiente de correlação $R^2 = 0,9018$;

$F_{0,95;5;6} = 4,39$.

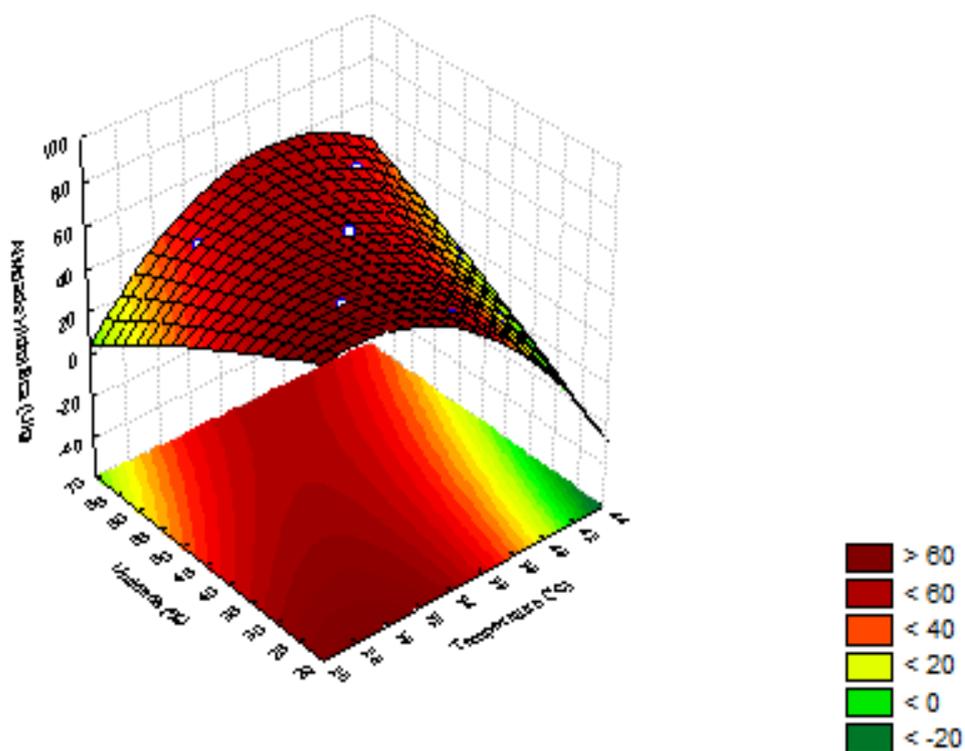


Figura 14: Superfície de resposta para a atividade hidrolítica produzida através da FES.

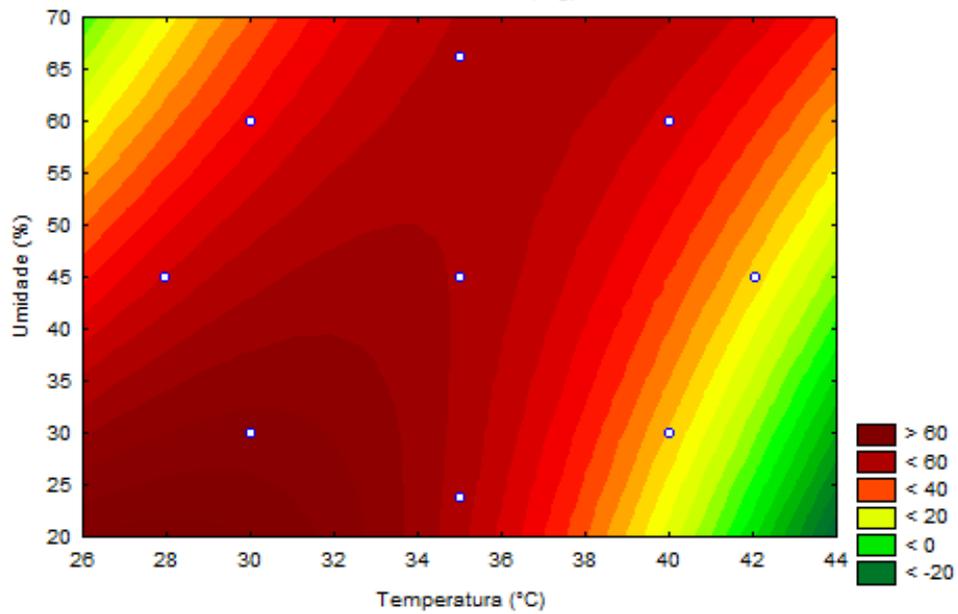


Figura 15: Curva de contorno para a atividade hidrolítica produzida através da FES.

A análise da superfície de resposta e da curva de contorno (Figuras 14 e 15) mostram a região ótima (área vermelha mais escura da curva de contorno) para a obtenção de elevada atividade hidrolítica através da fermentação em estado sólido da farinha de sementes de abóbora. A região de maximização da atividade hidrolítica compreende o intervalo de temperatura entre 26 e 33,5 °C e o intervalo de umidade entre 20 e 30%.

5 – CONCLUSÃO

Neste trabalho foi avaliada a influência dos parâmetros umidade inicial do substrato e temperatura, na fermentação de farinha de sementes de abóbora para produção de lipase microbiana. A interação entre a temperatura e a umidade foram os parâmetros que influenciaram positivamente o processo ao nível de significância de 95% de confiança. Através da metodologia de superfície de reposta verificou-se que a máxima produção de lipase pode ser obtida quando utilizada temperatura de fermentação entre 26,0 e 33,5 °C e umidade inicial de substrato entre 20% e 30%. As sementes de abóbora, comumente descartadas em lixos domésticos, têm demonstrado potencial como substrato natural (sem adição de suplementos) em fermentação em estado sólido visando a obtenção de lipase fúngica de *Aspergillus niger*, uma vez que apresentaram elevado teor de lipídios (42,97%) e uma considerável fonte de proteínas (26,52%). Sendo a produção de enzimas normalmente de custo elevado, é de grande valia o desenvolvimento biotecnológico de novas formas de aproveitamento de resíduos agroindustriais, que se aproveitados de forma natural podem minimizar de maneira significativa os custos do processo.

CAPÍTULO II

Avaliação do potencial de imobilização da lipase de *Aspergillus niger* em matrizes hidrofóbicas: Caracterização bioquímica da enzima na forma livre e imobilizada

RESUMO

SANTOS, R. C. A., MSc., Universidade Federal de Sergipe; Fevereiro, 2011.
Avaliação do potencial de imobilização da lipase de *Aspergillus niger* em matrizes hidrofóbicas: Caracterização bioquímica da enzima na forma livre e imobilizada.
Orientadora: Luciana Cristina Lins de Aquino.

As lipases têm recebido, atualmente, bastante atenção por serem catalisadores versáteis com aplicabilidade em uma vasta gama de processos industriais, entretanto, quando utilizadas na forma livre, apresentam como grande desvantagem, a impossibilidade de reutilização. Como alternativa, surgiu a técnica de imobilização. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial de imobilização da lipase, em matrizes hidrofóbicas (sílica e membranas de fibra oca de poliétersulfona), e realizar a caracterização bioquímica da mesma na forma livre e imobilizada. A lipase foi produzida através da fermentação em estado sólido da farinha de sementes de abóbora, contendo 30% de umidade à 30 °C por 120 horas, pelo *Aspergillus niger*. A lipase pré-purificada foi imobilizada na sílica e na membrana por adsorção física e ligação covalente, a fim de selecionar a matriz que proporcionasse maior rendimento de imobilização. A lipase livre e o biocatalisador imobilizado (BI) foram caracterizados quanto ao efeito do pH, temperatura, estabilidade térmica e foram determinados os parâmetros cinéticos. Dentre as matrizes testadas, maior rendimento de imobilização de lipase (81,85%) foi obtido por adsorção física em sílica. A enzima livre apresentou maior atividade hidrolítica em pH 4,0, demonstrando caráter ácido, e em temperatura de 37 °C. Entretanto, quando imobilizada em sílica o pH e temperatura de maior atividade hidrolítica foram 11,0 e 50 °C, respectivamente. A lipase livre apresentou estabilidade em pH 6,0 à 30 °C e o BI em pHs 4,0; 6,0 e 11,0 à 37 °C durante quatro horas. O BI apresentou menor velocidade máxima de reação (hidrólise de azeite de oliva) ($V_{\text{máx}}=0,020$ U/ mg) e maior constante de Michaelis-Menten ($K_m =130,1$ mmol) do que os obtidos pela enzima livre ($V_{\text{máx}}$ de 0,028 U/ mg e $K_m= 119,0$ mmol), o que demonstrou menor afinidade pelo substrato. A caracterização bioquímica da lipase na forma livre e imobilizada foi realizada com o intuito de determinar as condições mais adequadas para aplicações futuras da enzima em processos de interesse industrial.

Palavras-Chave: enzima, matrizes hidrofóbicas, caracterização bioquímica.

ABSTRACT

SANTOS, R. C. A., MSc., Universidade Federal de Sergipe; Fevereiro, 2011.
Evaluation of the immobilization potential of lipase from *Aspergillus niger* in hydrophobic matrices: Biochemical characterization of the enzyme in the free and immobilized form. Orientadora: Luciana Cristina Lins de Aquino.

Lipases have received, nowadays, a lot of attention because they are versatile catalysts with applicability in a wide range of industrial processes, however, when used in the free form have the huge disadvantage of the impossibility of reuse. Alternatively, did the immobilization technique. In this context, the aim of this work was evaluating the immobilization potential of lipase in hydrophobic matrices (silica and hollow fiber membranes of polyethersulfone) and performing its biochemical characterization in the free and immobilized forms. Lipase was produced through solid state fermentation of pumpkin seeds flour containing 30% of moisture at 30 °C, for 120 hours, by *Aspergillus niger*. Pre-purified lipase was immobilized on silica and membrane by adsorption and covalent binding in order to select the matrix that would provide a greater yield of immobilization. Free lipase and the immobilized biocatalyst (BI) were evaluated with respect of the pH effect, temperature, thermal stability and the kinetics parameters were determined. Among the tested matrices, the highest yield of lipase immobilization (81,85%) was obtained by physical adsorption on silica. Free lipase showed the highest hydrolytic activity at pH 4,0, showing acidic character, and at 37 °C. However, when immobilized on silica the pH and temperature of greater hydrolytic activity were at 11,0 and 50 °C, respectively. Free lipase was stable at pH 6,0 at 30 °C and (BI) at pH 4,0, 6,0 and 11,0 at 37 °C for four hours. BI showed a lower speed of reaction (olive oil hydrolysis) ($V_{\text{máx}}=0,020$ U/ mg) and higher Michaelis Menten constant ($K_m=130,1$ mmol) than those obtained by the free enzyme ($V_{\text{máx}}=0,028$ U/ mg; $K_m=119,0$ mmol), which demonstrated lower affinity by the substrate. Biochemical characterization of lipase in the free and immobilized form was performed in order to determine the most appropriated conditions for future applications of the enzyme in processes of industrial interest.

Keywords: enzyme, hydrophobic matrices, biochemical characterization.

1 – INTRODUÇÃO

As lipases, devido às suas propriedades funcionais (atividade, seletividade e especificidade), se tornaram bastante atrativas para o emprego como catalisadores capazes de atuar sob as mais brandas condições reacionais, modificando com relativa velocidade, os grupos funcionais (entre outros grupos semelhantes) presentes no substrato (GUISAN, 2006; SEBRÃO *et al.*, 2007). Portanto, as lipases são catalisadores versáteis com aplicabilidade em uma vasta gama de processos industriais, como: indústria têxtil, de papel, de detergentes, oleoquímica, de alimentos, farmacêutica (SHARMA *et al.*, 2001; SAXENA *et al.*, 2003; HASSAN *et al.*, 2006).

A maioria das lipases produzidas tem sido purificada e caracterizada em termos de atividade e perfis de estabilidade em relação ao pH, temperatura, efeito de íons metálicos e agentes quelantes (SHARMA *et al.*, 2001; SAXENA *et al.*, 2003). As lipases podem ser utilizadas tanto na forma livre como imobilizada.

Na forma livre, as lipases apresentam como grande desvantagem, a impossibilidade de reuso, caracterizando perdas econômicas, uma vez que possuem um alto valor de mercado. Como tentativa para contornar este problema, surgiu a técnica de imobilização de enzimas (GUISAN, 2006; SEBRÃO *et al.*, 2007; PAULA *et al.*, 2008). O termo imobilização de enzimas define a enzima que está fisicamente confinada ou localizada em uma certa região do espaço (na superfície do suporte ou em seu interior - poros), com a possibilidade de reuso em reatores contínuos, com fácil separação do catalisador-produto e com um aumento na produtividade do processo (massa de produto formado/ unidade de tempo) (GUISAN, 2006; PAULA *et al.*, 2008; BON *et al.*, 2008). O biocatalizador imobilizado deve manter, ao mesmo tempo, as características físicas do suporte e a atividade biológica da enzima na forma solúvel (BON *et al.*, 2008).

A imobilização de enzimas consiste basicamente, na escolha do suporte e do método de imobilização, sendo que o biocatalizador imobilizado deve ser ativo e estável (PAULA *et al.*, 2008). Existe uma grande diversidade de materiais que podem ser empregados como suportes na imobilização de enzimas. Quanto à composição, os suportes classificam-se em orgânicos (naturais e sintéticos) e inorgânicos (minerais e fabricados) (YE *et al.*, 2005; SCHMIDELL *et al.*, 2007). Quanto à morfologia, classificam-se em porosos e não-porosos (GUISAN, 2006). É importante que os

suportes empregados tenham as seguintes características: baixo custo, inertes, biocompatibilidade, fáceis de derivatizar, resistentes à compressão (GUISAN, 2006).

Os métodos de imobilização mais utilizados são: adsorção física, ligação covalente, ligação cruzada e encapsulação (SHARMA *et al.*, 2001; DALLA-VACCHIA *et al.*, 2004; SEBRÃO *et al.*, 2007). Após a imobilização, algumas propriedades da enzima podem ser alteradas, tais como a atividade catalítica e a estabilidade térmica (GUISAN, 2006).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de imobilização da lipase, produzida pelo fungo *Aspergillus niger*, nas seguintes matrizes hidrofóbicas: em sílica e em membranas de fibra oca de poliétersulfona. Após a verificação do potencial de imobilização e a seleção do biocatalisador imobilizado (BI), realizou-se a caracterização bioquímica da enzima produzida na forma livre e imobilizada.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Métodos de Imobilização de Enzimas

Na biocatálise, torna-se desvantagem a utilização em processos industriais de enzimas na forma livre devido a sua difícil recuperação, inativação em processos contínuos e impossibilidade de reutilização. Por isso, desde a década de 70, tem sido cada vez mais crescente o desenvolvimento de tecnologias para a obtenção de biocatalisadores imobilizados (KARTAL *et al.*, 2009).

A imobilização de enzimas pode ser considerada um processo de insolubilização, uma vez que impede a livre difusão do catalisador na mistura de reação. Desta forma, as enzimas estão física ou quimicamente limitadas em seu movimento, de modo que é possível recuperá-las do meio reacional mediante ações físicas. A tecnologia une os conhecimentos da química, bioquímica, biologia celular e engenharia, buscando sempre ampliar as aplicações das enzimas na conversão de matérias-primas, normalmente de baixo custo, em produtos de maior valor agregado e com menor impacto ambiental (BON *et al.*, 2008).

A depender do método de imobilização utilizado e do suporte empregado, as propriedades catalíticas da enzima, tais como estabilidade, seletividade, valores de K_m e $V_{máx}$, pH e características de temperatura, podem ser significativamente alterados (BAYRAMOGLU *et al.*, 2002; YE *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2006; BON *et al.*, 2008; KARTAL *et al.*, 2009; OZYILMAZ, 2009). O custo da imobilização deve ser reduzido, de modo a compensar a perda de atividade biocatalítica durante o processo de imobilização (BON *et al.*, 2008).

Os métodos de imobilização são classificados de acordo com a natureza da interação responsável pela imobilização e o tipo do suporte como descrito a seguir (BON *et al.*, 2008):

- Ligação em suportes: as enzimas são modificadas por meio de técnicas apropriadas, com o intuito de torná-las imóveis no meio reacional;
- Enzimas solúveis sem derivatização: as enzimas estão na forma solúvel, presas em um reator por membranas semipermeáveis de ultrafiltração, que permitem apenas a saída do meio reacional;

- Enzimas solúveis com derivatização: as enzimas são ligadas a outras macromoléculas, ficando com a mobilidade restringida, entretanto, o complexo permanece solúvel em água.

As técnicas de imobilização de enzimas em suportes baseiam-se em interações químicas (adsorção, ligação covalente, ligação cruzada) e em interações físicas (encapsulamento em microcápsulas ou em matrizes poliméricas) (DURÁN *et al.*, 2002; DALLA-VECHIA *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 2009). Tanto as interações físicas como as interações químicas oferecem vantagens e desvantagens que dependem de vários fatores. As interações químicas geralmente tendem a reduzir a atividade enzimática, devido à formação de ligações covalentes que modificam a estrutura tridimensional da enzima. No entanto, as ligações covalentes promovem uma forte e estável ligação entre a enzima e o suporte, onde, em alguns casos, pode alterar a especificidade da enzima. As interações físicas prejudicam menos a estrutura da enzima e conseqüentemente oferecem uma maior retenção das propriedades enzimáticas. Geralmente é preferível uma enzima imobilizada com menor atividade inicial, mas com maior estabilidade, do que uma enzima imobilizada com uma elevada atividade inicial, mas com baixa estabilidade (DURÁN *et al.*, 2002). A Figura 16, abaixo, mostra a classificação dos métodos de imobilização:

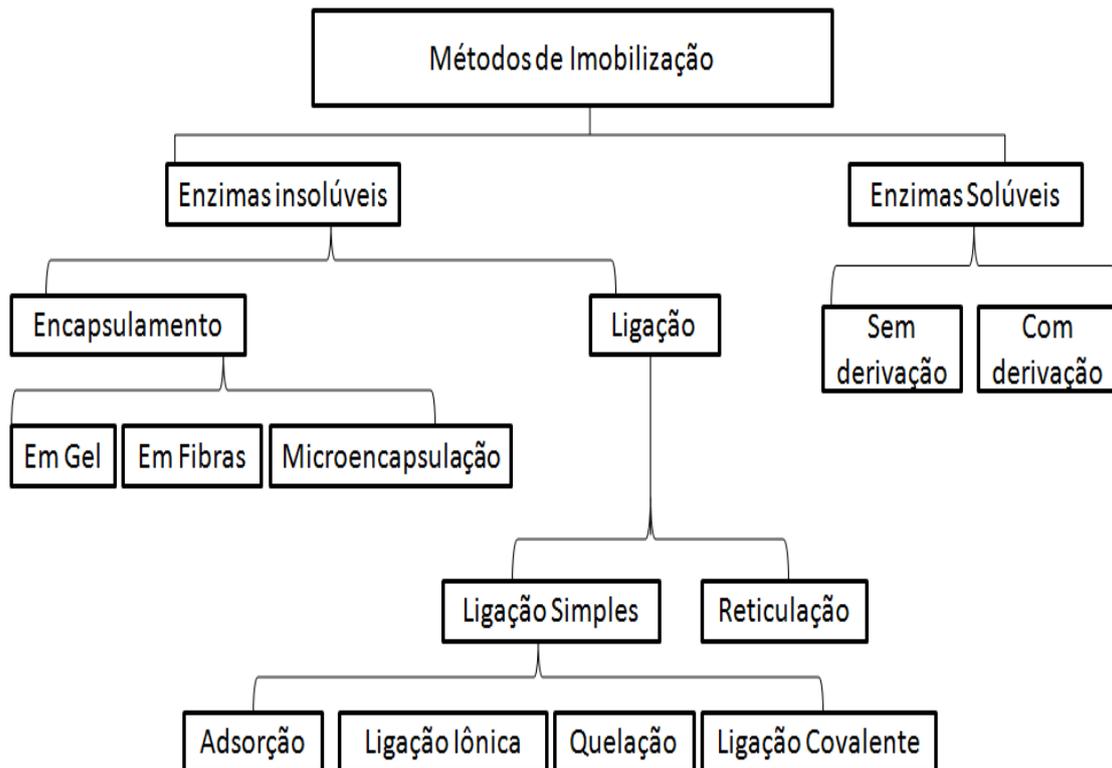


Figura 16: Métodos de imobilização de enzimas em suportes (Fonte: BON *et al.*, 2008).

Os métodos de imobilização mais comumente relatados na literatura são:

Adsorção

Na adsorção, a enzima é retida na superfície do suporte insolúvel, que se encontra em meio aquoso, mediante forças físicas de Van der Waals, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e interações específicas. Entretanto, por não ser um método específico, pode provocar a inativação total ou parcial da enzima, o que requer, neste caso, a utilização de suportes com alta afinidade pela enzima a fim de reduzir a inativação (BON *et al.*, 2008). Os suportes de imobilização (adsorventes) podem ser naturais (orgânicos e inorgânicos) ou polímeros sintéticos (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005; DALLA-VECHIA *et al.*, 2004; HANEFELD *et al.*, 2008; CARDOSO *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2009).

Para a imobilização da enzima, basta colocar uma solução aquosa desta em contato físico com o suporte durante um determinado tempo. Porém, a união obtida é frágil e sua estabilidade baseia-se mais na quantidade de forças envolvidas do que na

qualidade destas. Por isso, às vezes a enzima liberta-se do adsorvente com certa facilidade por mudanças de temperatura, pH, força iônica ou concentração de substrato. As principais vantagens desse método são a simplicidade e o fato de que a atividade da enzima não é afetada (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Este método de imobilização é o mais simples e o mais antigo na produção de enzimas imobilizadas (YADAV & JADHAV, 2005; GHAMGUI *et al.*, 2007; BON *et al.*, 2008; WANG & HSIEH, 2008; MENONCIN *et al.*, 2009).

Ligação Covalente

Este tipo de união é muito estável, uma vez que os átomos que unem o suporte e a enzima compartilham pares de elétrons. Porém, às vezes é necessário tratar o suporte previamente com reagentes específicos, como o glutaraldeído (introduz grupos carbonila), podendo-se produzir mudanças na conformação da enzima, com eventuais perdas de sua atividade (WANG & HSIEH, 2008; CARDOSO *et al.*, 2009). A imobilização é feita em duas partes: na primeira, o suporte é tratado com um reativo que ativa alguns de seus grupos funcionais; em seguida, o suporte ativado é misturado com a enzima e ambos se unem (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

A utilização de espaçadores, como por exemplo gelatina, polietilenoglicol, dextrana e albumina de soro bovino, entre a enzima e o suporte possibilita à enzima uma maior flexibilidade conformacional. Isto é uma vantagem para as enzimas como as lipases, que são conhecidas por sofrerem significativas mudanças conformacionais ao reagirem com o substrato. Por outro lado, a utilização de espaçadores curtos conferem à enzima maior estabilidade térmica, uma vez que restringem a mobilidade da enzima e evita desdobramentos (HANEFELD *et al.*, 2008).

Neste tipo de imobilização, há a formação de ligações covalentes entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos da enzima (o NH₂ da lisina e arginina; o CO₂H do ácido aspártico ou glutâmico; o OH da serina ou tionina e o grupo SH da cisteína) (CARDOSO *et al.*, 2009).

Ligação Cruzada

No procedimento da imobilização por ligação cruzada, as moléculas de enzima são quimicamente ligadas umas com as outras, através de reativos polifuncionais (geralmente o glutaraldeído). Dessa maneira, ocorre a formação de agregados insolúveis de grande peso molecular e a enzima funciona como catalisador e como suporte. Então, o agregado formado é praticamente puro e elimina as vantagens e desvantagens de uso de suportes (HANEFELD *et al.*, 2008; CARDOSO *et al.*, 2009).

As desvantagens deste método são a baixa capacidade de retenção da atividade e a baixa resistência mecânica, além da pouca reprodutibilidade, o que dificulta a sua aplicação industrial (CARDOSO *et al.*, 2009).

Encapsulação

É um método de grande utilidade em escala industrial. Neste método, a enzima é retida entre membranas semipermeáveis que permitem a passagem dos substratos e dos produtos, mas não a das enzimas (DALLA-VECHIA *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 2009). Consequentemente, somente substratos de baixo peso molecular podem ser empregados (BON *et al.*, 2008).

A solução aquosa enzimática é misturada com o monômero hidrófilo e emulsifica-se em solvente orgânico imiscível em água. Posteriormente, adiciona-se outro monômero hidrófobo e solúvel na fase orgânica, o qual reage com o monômero hidrófilo, formando uma película de polímero na camada limite entre as fases aquosa e orgânica, resultando na imobilização da enzima (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

A grande vantagem desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o suporte, evitando, desta forma, mudanças na estrutura tridimensional da enzima. O fator limitante desta técnica é a velocidade de difusão dos substratos e dos produtos através da membrana e, portanto, são necessárias altas concentrações de substratos para reduzir este problema (HANEFELD *et al.*, 2008; CARDOSO *et al.*, 2009).

A figura 17 esquematiza os principais métodos de imobilização de enzimas.

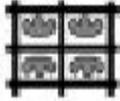
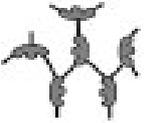
Métodos de imobilização de Enzimas					
Enzimas Encapsuladas		Enzimas Ligadas			
Em matriz polimérica	Em microcápsula	Ligação Covalente	Ligação Cruzada	Adsorção Física	Adsorção Iônica
					

Figura 17: Principais métodos de imobilização de enzimas (CARDOSO *et al.*, 2009).

2.2- Vantagens e Limitações da Técnica de Imobilização

Em geral, utiliza-se a imobilização quando uma enzima é difícil de ser isolada ou quando é muito dispendioso prepará-la. A imobilização enzimática proporciona algumas vantagens, como: reutilização das enzimas por um período maior de tempo, já que ao final do processo a enzima não precisa ser desnaturada; operação do processo de forma contínua e maior controle de pH e temperatura para alcançar a atividade ideal; facilidade de separação entre o produto e a enzima, uma vez que o biocatalisador imobilizado não é solúvel no meio reacional; a reação pode ser interrompida quando um determinado grau de conversão é alcançado; redução do volume de reação uma vez que a enzima imobilizada permite a alta concentração enzimática em um volume reduzido no reator (FELLOWS, 2006; BON *et al.*, 2008).

O sucesso da tecnologia de imobilização mostra que, de modo geral, as vantagens superam as limitações. Porém, alguns fatores devem ser apontados, não como uma desvantagem do processo, mas sim como pontos a serem evitados ou prevenidos (ROSEVEAR *et al.*, 1987; ZANIN & MORAES, 2004; BON *et al.*, 2008):

- Como os métodos de imobilização, de modo geral, envolvem interações fracas (forças de van der Waals), ou fortes (ligação covalente), entre a frágil estrutura da proteína enzimática e o suporte, invariavelmente há uma alteração da estrutura tridimensional da proteína, resultando em menor atividade. Para superar este problema, pode-se oferecer uma elevada concentração de enzima em relação ao suporte;

- Durante a imobilização podem ocorrer alterações de orientação e acesso do substrato ao sítio ativo, reduzindo a atividade enzimática, ou ainda levando à redução aparente da especificidade ao substrato. A solução para este problema consiste em proteger o sítio ativo da enzima durante o processo de imobilização, empregando uma alta concentração de substrato ou um inibidor de sítio ativo. Nestes casos, as substâncias protetoras devem ser facilmente removidas ao final do processo de imobilização.

O sucesso da imobilização depende da estrutura da enzima, do método de imobilização e do tipo do suporte. Os suportes que proporcionam uma elevada atividade e estabilidade da enzima, geralmente apresentam sérias limitações de resistência mecânica e de queda de pressão, o que inviabiliza seu uso em alguns tipos de reatores (BAYRAMOGLU *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2006; PAULA *et al.*, 2008; KARTAL *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2009).

2.3- Suportes para a Imobilização de Enzimas

Na seleção do tipo de material que pode ser utilizado para a imobilização de enzimas deve-se levar em consideração a resistência do suporte ao meio operacional, isto é, o suporte deve ser pouco solúvel no meio, principalmente em condições de operação, a superfície de contato e a porosidade, fatores esses, que afetam a atuação da enzima. De acordo com sua morfologia os suportes podem ser classificados, em (GUISAN, 2006):

- 1- Porosos: possuem como vantagem, a grande área superficial, uma vez que a distribuição das enzimas se dá tanto na face externa quanto interna dos poros. Desta forma, o tamanho dos poros deve ser grande o suficiente para acomodar a enzima e permitir o acesso ao substrato.
- 2- Não-porosos: sua principal vantagem é a acomodação das moléculas de enzima apenas na superfície externa, o que facilita a interação da enzima com o substrato. A grande desvantagem destes suportes é a pequena área superficial.

De acordo com a composição os suportes classificam-se em (YE *et al.*, 2005; SCHMIDELL *et al.*, 2007; PAULA *et al.*, 2008):

1-Orgânicos:

- Naturais: alginato (ELLAIAH *et al.*, 2004; YADAV & JADHAV, 2005), ágar (KUROIWA *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2008), celulose (FISHMAN *et al.*, 2002), agarose (RODRIGUES *et al.*, 2008), dextrana (GONÇALVES *et al.*, 1999), quitina (VAILLANT *et al.*, 2000), quitosana (HUANG *et al.*, 2007; TAN *et al.*, 2002; YE *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2008), seda (CHEN *et al.*, 2010), k-carragenina (ELLAIAH *et al.*, 2004).
- Sintéticos: nylon (VAILLANT *et al.*, 2000; PAHUJANI *et al.*, 2008), poliacrilamida (ELLAIAH *et al.*, 2004), polivinílicos (YANG & HSIEH, 2008; KARTAL *et al.*, 2009; OZTURK & KILINC, 2010).

2-Inorgânicos:

- Minerais: bentonita (YESILOGLU, 2005; SEDAGHAT *et al.*, 2009), pedrapomes (PAZARLIOGLU & TELEFONCU, 2005).
- Fabricados: cerâmica (IDA *et al.*, 2000; SHELDON & SMALL, 2005), sílica (YADAV & JADHAV, 2005; CRUZ *et al.*, 2009), vidro (GÓMEZ *et al.*, 2006; GIRELLI *et al.*, 2007; KAHRAMAN *et al.*, 2007), alumina (COSTA *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2007).

Deve-se ressaltar que há a possibilidade de utilizar a combinação desses materiais para a produção de novas matrizes imobilizadoras e de modificar a superfície dos suportes, de modo a introduzir grupos funcionais que serão responsáveis pela imobilização (SCHMIDELL *et al.*, 2007).

Além dessas características, os suportes ainda devem apresentar: resistência ao ataque microbiológico de modo a evitar a liberação da enzima para a solução; estabilidade ao escoamento, o que pode ser conseguido pelo emprego de partículas esféricas, rígidas e de tamanho uniforme; regenerabilidade, para possibilitar o reuso; natureza hidrofílica, com a finalidade de obter uma boa difusividade do substrato e permitir a estabilização da enzima (BON *et al.*, 2008). As matrizes hidrofóbicas sol-gel e as membranas poliméricas estão entre os suportes empregados na literatura para a imobilização de enzimas (SOARES *et al.*, 2004a; PAULA *et al.*, 2008; YILMAZ *et al.*, 2010; GUPTA *et al.*, 2010).

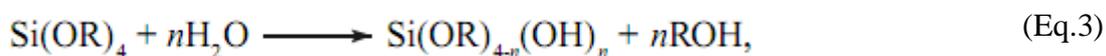
2.3.1- Imobilização de lipases em matriz hidrofóbica sol-gel

Vários tipos de suportes, preparados com diversos tipos de materiais, são estudados na literatura com a finalidade de imobilizar enzimas. Entretanto, as mais recentes tecnologias requerem materiais com combinação de propriedades que não são encontradas nos materiais convencionais. O processo sol-gel é indiscutivelmente o mais empregado no preparo de matrizes híbridas (JOSÉ & PRADO, 2005; PAULA *et al.*, 2008; YILMAZ *et al.*, 2010).

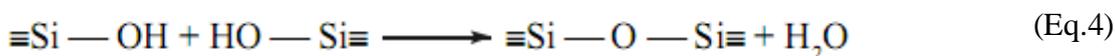
Diversas variáveis como o tempo e a temperatura da reação, natureza do catalisador e concentração de solventes influenciam o processo sol-gel e determinam as características finais dos materiais, como a homogeneidade do produto e a condensação de grupos reativos (JOSE & PRADO, 2005). Dependendo da natureza do precursor inorgânico utilizado, o processo sol-gel pode ser dividido na classe dos sais e na classe dos alcoóxidos. No entanto, os precursores do tipo alcoóxido são os mais utilizados atualmente (ALFAYA & KUBOTA, 2002).

O processo sol-gel trata de qualquer rota de síntese de materiais, onde num determinado momento ocorre a transição de um sistema sol para um sistema gel. O termo sol define uma suspensão de partículas coloidais (dimensão entre 1 e 100 nm) estável num fluido. O termo gel é definido como uma estrutura rígida de partículas coloidais ou cadeias poliméricas (gel polimérico), que imobiliza a fase líquida em seus interstícios (ALFAYA & KUBOTA, 2002).

A reação química envolvida no processo sol-gel convencional pode ser dividida em duas etapas. A primeira etapa (Eq.3) corresponde à hidrólise do grupo alcoóxido, o tetraetilortosilicato, com a formação de grupos reativos do tipo silanol.



A segunda etapa (Eq.4) envolve a condensação do grupo silanol, a qual leva, inicialmente, à formação do sol, e, posteriormente, ao gel (SOARES *et al.*, 2004a).



Ou



Apenas a primeira etapa do mecanismo sol-gel (a hidrólise) é bem conhecida, pois as reações de condensação começam antes das reações de hidrólise terminarem, o que torna o mecanismo complexo, já que envolve muitas reações simultâneas de hidrólise e condensação (ALFAYA & KUBOTA, 2002).

A imobilização de lipases comerciais (pancreática e lipase de *Candida rugosa* - LCR) em matriz hidrofóbica obtida pela técnica sol-gel, que consiste na hidrólise de alcóxidos tetraetilortosilicatos (TEOS), metiltrimetoxissilano (MTMS) e propildimetoxissilano (PDMS) em presença e ausência de aditivos estabilizantes na obtenção do suporte (polietilenoglicol/PEG-1450 e polivinilálcool/PVA), foi estudada por diferentes grupos de pesquisa (JAEGER & REETZ, 1998; TISCHER & KASCHE, 1999; SOARES *et al.*, 2004a; PAULA *et al.*, 2008). Os métodos de adsorção, ligação covalente e encapsulação são relatados na literatura. Nos métodos de adsorção e ligação covalente, os rendimentos foram de respectivamente 7 e 13% e o de encapsulação cerca de 32% (SOARES *et al.*, 2004a).

Suportes similares foram testados recentemente com sucesso utilizando a matriz híbrida constituída de polissiloxano-álcool polivinílico a partir da técnica sol-gel para a imobilização de lipase por adsorção e por ligação covalente, que apresentaram rendimento de respectivamente 96,5% e 81,5% (PAULA *et al.*, 2008). Portanto, estudos avaliando o potencial da técnica sol-gel para a produção de suportes com a finalidade de utilizá-los na biocatálise, atualmente, é foco de diversos grupos (ALFAYA & KUBOTA, 2002; CHAUBEY *et al.*, 2006; PAULA *et al.*, 2008; PINHEIRO *et al.*, 2008; SIMÕES *et al.*, 2010).

2.3.2- Imobilização de lipases em Membranas Poliméricas

Uma grande variedade de suportes tem sido utilizada para a imobilização de enzimas, dentre os quais estão as membranas poliméricas. As membranas oferecem a vantagem da alta área interna para o carregamento de enzimas. Além disso, podem ser derivatizadas, e há a possibilidade de separação do produto, nos casos em que o produto inibe a reação (VISHWANATH *et al.*, 1995).

A maioria das membranas disponíveis comercialmente são hidrofóbicas, apresentam uma baixa concentração de grupos funcionais para a ativação e imobilização, sendo necessária a modificação química da superfície das mesmas para torná-las suscetíveis à imobilização de enzimas. Já as membranas hidrofílicas são, às vezes, instáveis às condições de ativação e imobilização de enzimas, sendo necessária a escolha criteriosa da matriz e dos métodos de derivatização de acordo com a aplicação desejada (BEESKOW *et al.*, 1995; ZENG & RUCKENSTEIN, 1996; KLEIN *et al.*, 1997; WEISSENBORN *et al.*, 1997; CASTILHO *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, alguns pesquisadores têm imobilizado lipases em membranas poliméricas de polisulfona (GUPTA *et al.*, 2008; YUJUN *et al.*, 2008), poliétersulfona (GUPTA *et al.*, 2008), celulose (LU & HSIEG, 2009), membranas de poli(2-hydroxietilmetacrilato-co-metacrilamido-fenilalanina) (BAYRAMOGLU *et al.*, 2002), polipropileno (DENG *et al.*, 2004; PUJARI *et al.*, 2006), quitosana (TAN *et al.*, 2002; YE *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2007) e membranas de álcool polivinílico (WANG & HSIEH, 2008).

2.3.2.1- Membranas de Poliétersulfona

A poliétersulfona (PES) é um material polimérico bastante conhecido. Este tipo de membrana apresenta excelente estabilidade oxidativa, térmica e hidrolítica, assim como boas propriedades mecânicas e de formação de filmes. As membranas de PES têm sido amplamente utilizadas na separação por membranas para diversas aplicações, tais como: microfiltração e ultrafiltração, na área da biomedicina, alimentos, hemodiálise, purificação de água, entre outros (FANG *et al.*, 2009; QIAN *et al.*, 2009).

A membrana assimétrica de poliétersulfona é preparada através da técnica da inversão da fase úmida, através da troca de difusão do solvente com o não-solvente (água). A fase rica no polímero forma a matriz finamente porosa, enquanto que a fase pobre no polímero aumenta o tamanho dos poros. Embora a imobilização seja tratada como um fenômeno de superfície, a fina camada densa sobre a superfície microporosa da poliétersulfona melhora os resultados da fixação devido à difusão da enzima e do glutaraldeído (XU & QUSAY, 2004; GUPTA *et al.*, 2008). A estrutura química da membrana de fibra oca da poliétersulfona é mostrada na figura 18.

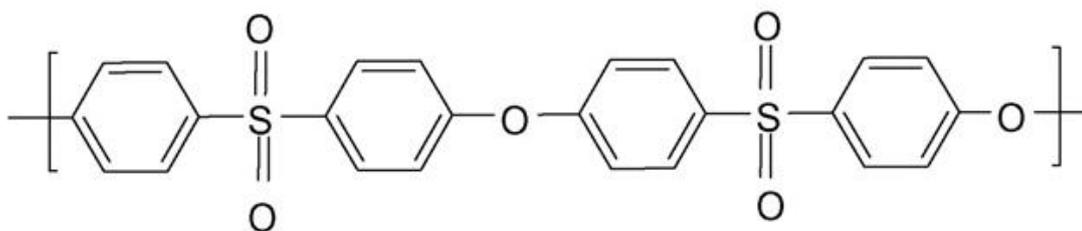


Figura 18: Estrutura química da poliétersulfona (Fonte: GUPTA *et al.*, 2008).

2.4- Propriedades catalíticas das lipases fúngicas

As lipases podem ser produzidas por um grande número de microrganismos, sendo que os fungos são uma das mais importantes fontes produtoras da enzima (DOELLE *et al.*, 1992). Existem na literatura relatos de lipases produzidas por diversos fungos, dentre os quais destacam-se os dos gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum* e *Rhizopus*. Por serem produzidas por diferentes espécies fúngicas e até mesmo pela posição celular que ocupam (intra ou extracelular), as lipases apresentam diferentes propriedades catalíticas. Tais propriedades precisam ser estudadas de modo, a saber, em que tipo de reações e sob que condições estas enzimas podem atuar, a fim de não comprometer os processos industriais e biotecnológicos nos quais possam ser empregadas (POLAINA & MACCABE, 2007). As propriedades catalíticas mais relatadas na literatura são: efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática, estabilidade em pH e em temperatura, efeito de diferentes íons e efeito da concentração do substrato.

A teoria de Arrhenius foi utilizada pela primeira vez em seus estudos sobre a dissociação de eletrólitos. Atualmente, ela é utilizada para descrever a relação entre a temperatura e a velocidade das reações químicas e físicas (SCHWAAB & PINTO, 2007; RODRÍGUEZ-DÍAZ & SANTOS-MARTÍN, 2009). Segundo esta teoria, para que os reagentes sejam transformados em produtos, precisam de uma quantidade mínima de energia. À medida que a temperatura do meio reacional aumenta, aumentam também as colisões entre as moléculas, o que acaba gerando energia para transformar reagente em produto, sendo que isto ocorre em intervalos de temperatura compatíveis com a manutenção da estrutura tridimensional enzimática (SCHWAAB & PINTO, 2007). Entretanto, temperaturas muito elevadas ocasionam a desnaturação enzimática por romper as ligações químicas responsáveis pela manutenção de sua estrutura (LIMA

& ANGNES, 1999). O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática depende de fatores como: pH, força iônica, presença de íons, pressão, atividade de água e presença de agentes desnaturantes (LIMA & ANGNES, 1999; SHARMA *et al.*, 2001).

O pH é um importante parâmetro na determinação da atividade enzimática, uma vez que a maioria das reações enzimáticas envolve a catálise em meios ácidos e básicos. A atividade das enzimas varia de acordo com o pH a que sejam submetidas (BAYINDIRLI, 2010). As enzimas, por serem proteínas globulares, sofrem os mesmos efeitos estruturais causados pela variação do pH e da temperatura. O pH ótimo das enzimas é aquele onde a atividade e a velocidade das reações são máximas. A velocidade da reação diminui à medida que o pH se distancia do ótimo. O pH ótimo, por sua vez, depende do número e tipo de grupos ionizáveis que a enzima possui (VIEIRA *et al.*, 2003).

Vários pesquisadores têm investigado os efeitos da temperatura e do pH na atividade de lipases fúngicas na forma livre e na forma imobilizada (tabela 7).

Tabela 7: Características bioquímicas de lipases livre e imobilizadas.

Lipase	Microrganismo Produtor da lipase	pH ótimo	Temperatura ótima	Estabilidade em pH	Estabilidade térmica	Referência
Livre	<i>Rhizopus</i> sp.	6,0-6,5	40°C	5,6-8,0	40-55°C	Pastore <i>et al.</i> (2003)
Livre	<i>A. niger</i>	7,0	37 °C	4,0-10,0	4-50°C	Kamini <i>et al.</i> , (1998)
Livre	<i>A. niger</i>	2,5	50 °C	8,0-11,0	40°C por 3h	Mhetras <i>et al.</i> , (2009)
Livre	<i>Aspergillus niger</i>	2,5-3,0	45°C	2,5-9,0	60°C por 5h	Mahadik <i>et al.</i> , (2002)
Livre	<i>Mucor</i> sp.	7,0	35°C	5,0-7,0	30-45°C por 1 hora	Abbas <i>et al.</i> , (2002)

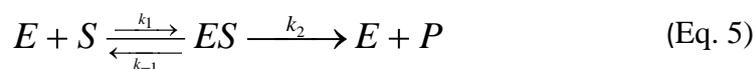
Tabela 7 (Continuação): Características bioquímicas de lipases livre e imobilizadas.

Lipase	Microrganismo Produtor da lipase	pH ótimo	Temperatura ótima	Estabilidade em pH	Estabilidade térmica	Referência
Livre	<i>Penicillium simplicissimum</i>	5,0-6,0	37-45°C	5,0-6,0	50°C por 1 h	Gutarra <i>et al.</i> , (2009)
Livre	<i>Geotrichum sp</i>	9,5	20°C	6,0-9,0	25°C por 72h	Cai <i>et al.</i> (2009)
Imobilizada em celulose	<i>Rhizopus oryzae</i>	8,3	40 °C	3,0-8,0	45°C por 1h	Karra- Châabouni <i>et al.</i> , (2008)
Imobilizada em sílica	<i>Mucor javanicus</i>	9,0	-	-	50°C por 2h	Kim <i>et al.</i> , (2006)
Imobilizada em carbonato de cálcio	<i>Rhizopus oryzae</i>	7,0	37°C	-	50°C por 24h	Ghamgui <i>et al.</i> , (2007)

2.4.1 - Cinética Enzimática

As enzimas, devido ao seu importante papel na cinética das reações bioquímicas, são amplamente investigadas experimental e teoricamente, através do mecanismo de Michaelis-Menten, que é bastante utilizado para compreender a atividade catalítica de cada enzima. De acordo com este mecanismo, o substrato S liga-se reversivelmente à enzima E, para formar um complexo intermediário ES. Em seguida, ES sofre decomposição unimolecular para formar um produto P, e E é regenerado para reutilização em um novo ciclo, conforme mostra o esquema abaixo. Onde k_1 é a constante de formação do complexo ES; k_{-1} é a constante de dissociação e k_2 é a constante de formação do produto (TZAFRIRI & EDELMAN, 2007; CALDER & SIEGEL, 2008; YI & LIU, 2010). É importante ressaltar que, inicialmente, a concentração do substrato é máxima, a enzima é totalmente livre e não há produto

(TZAFRIRI & EDELMAN, 2007). O esquema da reação entre enzima e substrato para formação do produto está demonstrado na equação 5.



À medida que a concentração do substrato S aumenta, a atividade catalítica da enzima aumenta de forma hiperbólica, aproximando-se de uma velocidade máxima, $V_{\text{máx}}$ – específica para cada enzima, onde praticamente toda enzima está na forma do complexo ES (TZAFRIRI & EDELMAN, 2007; CARVALHO *et al.*, 2010; YI & LIU, 2010). A concentração do substrato que produz metade da velocidade máxima é a constante de Michaelis-Menten, K_m , que é específica para cada enzima. A equação de Michaelis-Menten está descrita abaixo (GOLICNIK, 2010).

$$v = \frac{V_{\text{máx}} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde :

v = velocidade inicial

A fim de representar os resultados da equação de Michaelis-Menten por linhas retas, alguns métodos de ajuste linear são realizados. As representações lineares mais utilizadas, cujas equações estão citadas abaixo (equações 7, 8 e 9, respectivamente), são conhecidas pelos nomes dos bioquímicos que as utilizaram para tratar seus resultados: Lineweaver-Burk, Hanes e Eadie-Hofstee (RITCHIE & PRVAN, 1996; BON *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2010).

- Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \quad (\text{Eq. 7})$$

- Hanes

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \cdot [S] \quad (\text{Eq. 8})$$

- Eadie-Hofstee

$$v = V_{m\acute{a}x} - K_m \cdot \frac{v}{[S]} \quad (\text{Eq. 9})$$

Alguns pesquisadores determinaram os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para lipases obtidas a partir de diferentes microrganismos. Pastore *et al.* (2003) determinaram para a lipase de *Rhizopus sp.* K_m de 0,055 mM e $V_{m\acute{a}x}$ de 1,99 μM . Kamini *et al.* (1998) obtiveram para a lipase de *Aspergillus niger* K_m de 4,55 mM. Karra-Ch\^a\^abouni *et al.*, (2008) obtiveram para a lipase imobilizada em celulose valores de K_m de 23,36 mmol/l e $V_{m\acute{a}x}$ de 0,80 $\mu\text{mol}/\text{min}$.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Materiais

A lipase parcialmente purificada utilizada neste trabalho foi obtida através da fermentação em estado sólido da farinha de sementes de abóbora (contendo 30 % de umidade), pelo fungo *Aspergillus niger*, à temperatura de 30 °C por 120 horas. As matrizes hidrofóbicas selecionadas foram as membranas de fibra oca de poliétersulfona (PES) (tamanho de corte de 50 kDa) adquiridas comercialmente da PAM-MEMBRANAS, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro e a sílica obtida pela técnica sol-gel com granulometria de 100 mesh doada pelo ITP/UNIT. E todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2 – Metodologia Experimental

3.2.1 – Purificação parcial da lipase produzida

A lipase produzida a partir da fermentação em estado sólido da farinha de sementes de abóbora contendo 30% de umidade, à 30 °C por 120 horas foi parcialmente purificada através de precipitação com sulfato de amônio. O procedimento consistiu em adicionar o tampão fosfato pH 7,0, na proporção 5 mL por g de fermentado, e deixar em contato por 15 minutos à 30 °C. Adicionou-se ao sobrenadante obtido sulfato de amônio a 80%, deixando-se à 4°C por 30 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 1.000 rpm durante 10 minutos. O extrato obtido foi filtrado e dialisado (peso de corte de 10.000 a 12.000 kDa) contra água destilada a 4 °C durante 20 horas e liofilizado à -50 °C a uma pressão de 40 µHg (Figura 19).



Figura 19: Lipase parcialmente purificada e liofilizada.

3.2.2 – Preparo dos biocatalisadores imobilizados

3.2.2.1 – Imobilização da enzima em matrizes hidrofóbicas por adsorção física

A imobilização da enzima nos suportes foi realizada segundo metodologia adaptada de Soares *et al.*, (2004b). O experimento consistiu em misturar 1 mL de solução enzimática (300 mg/mL) em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4,0, 9 mL de hexano e 1g de suporte, mantendo-se sob agitação durante 3 horas. Após este período, a solução foi mantida em repouso à temperatura de 4°C durante 24 horas. A enzima imobilizada foi recuperada por filtração à vácuo e lavada sucessivamente com hexano para remoção da lipase não adsorvida no suporte. Os filtrados foram analisados quanto aos teores de proteínas totais (Bradford, 1976) e atividade enzimática (Soares *et al.*, 1999). Para calcular o rendimento da imobilização (item 3.2.6), nos biocatalisadores imobilizados foram quantificados o teor de umidade e a atividade enzimática.

3.2.2.2- Ativação das matrizes hidrofóbicas

Para ativação da membrana de poliétersulfona (PES) variou-se a concentração de glutaraldeído entre 1 e 5% (v/v), de acordo com a metodologia adaptada de (ROMDHANE *et al.*, 2010).

A ativação consistiu em adicionar 20 mL de glutaraldeído à 1 g da membrana de poliétersulfona, mantendo-se sob agitação à 120 rpm durante 1 hora à temperatura de 30 °C. Após a ativação, as membranas foram lavadas com água destilada para retirada do excesso de glutaraldeído, até que o pH da água da lavagem atingisse o pH da água. Após a seleção da melhor concentração de glutaraldeído para a membrana de poliétersulfona (PES) utilizou-se a mesma concentração para a imobilização da enzima em sílica.

3.2.2.3 – Imobilização da enzima por ligação covalente nos suportes ativados

Inicialmente, com a finalidade de selecionar a concentração de glutaraldeído que proporcionasse maior imobilização da enzima nas membranas de PES, os experimentos de imobilização foram realizados nas seguintes condições (adaptada de ROMDHANE *et*

al., 2010): misturar 10 mL de solução enzimática (100 mg/mL) em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4,0, com 1g de suporte ativado (com 1%, 2,5% e 5,0% de glutaraldeído), mantendo-se sob agitação durante 1 hora, à 30 °C.

Os experimentos subsequentes de imobilização nos suportes (sílica e membranas) ativados com a melhor concentração de glutaraldeído foram realizados nas seguintes condições: 1 g de suporte, 1 mL de solução enzimática em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4,0 (300 mg/mL) e 9 mL de hexano mantendo-se sob agitação durante 3 horas, de acordo com a metodologia adaptada de Soares *et al.*, (2004b). Após este período, a solução foi mantida em repouso à temperatura de 4°C durante 24 horas. A enzima imobilizada foi recuperada por filtração à vácuo e lavada sucessivamente com hexano para remoção da lipase não adsorvida no suporte. Os filtrados foram analisados quanto aos teores de proteínas totais (Bradford, 1976) e atividade enzimática (Soares *et al.*, 1999). Para calcular o rendimento da imobilização nos biocatalisadores imobilizados, foram quantificados o teor de umidade e a atividade enzimática.

A imobilização da enzima nos suportes, através da adsorção física e da ligação covalente, foi realizada de acordo com a figura 20 abaixo, onde PES significa membrana de fibra oca de poliétersulfona.

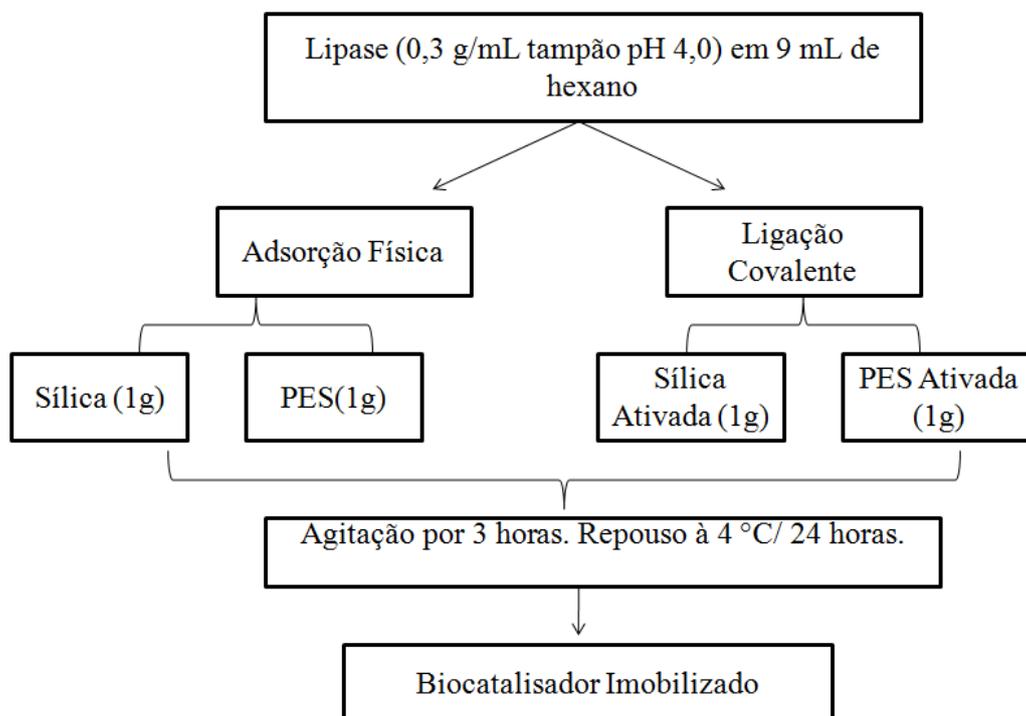


Figura 20: Esquema de preparo dos biocatalisadores imobilizados.

3.2.3 – Determinação da Atividade Hidrolítica

A atividade enzimática da lipase pré-purificada e do biocatalisador imobilizado (BI) foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva de acordo com o procedimento descrito por Soares *et al.* (1999), com algumas modificações. O substrato foi preparado utilizando-se azeite de oliva e goma arábica. Para o biocatalisador imobilizado, foram adicionados em frascos erlenmeyeres de 125mL: 2,5 mL do substrato, 1 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e o biocatalisador imobilizado (250 mg). Para a lipase parcialmente purificada foram adicionados 5 mL do substrato, 2 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e a enzima livre (10 mg/ mL). Os erlenmeyers foram incubados à 37 °C por 5 min., em banho termostatzado com agitação. Após este tempo a reação foi paralisada pela mistura de acetona e etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,04 M, utilizando fenoftaleína como indicador.

Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por min. de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em (1U/g=1µmol/g.min). Para cada análise de atividade foi realizado um branco (controle) utilizando 1 mL de tampão para a enzima livre ou 250 mg de suporte para o biocatalisador imobilizado.

Para a determinação da atividade da lipase parcialmente purificada e do biocatalisador imobilizado foi utilizada a equação 10 abaixo, conforme metodologia descrita por Soares *et al.*, (1999).

$$Atividade(U / g) = \frac{((V_a - V_b) \times M \times 10^3)}{m \times t} \quad (Eq.10)$$

Onde:

V_a = volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL);

V_b = volume de KOH gasto na titulação do branco (mL);

M = normalidade da solução de KOH;

t = tempo de reação (minutos);

m = massa de enzima usada na reação (g).

A atividade hidrolítica foi expressa em termos de atividade relativa (%), que é a divisão da atividade hidrolítica pela máxima atividade hidrolítica obtida.

3.2.4 – Quantificação do teor de proteínas nos filtrados

O teor de proteínas foi determinado pelo método colorimétrico de Bradford (1976), utilizando o reagente Comassie Blue. O procedimento consistiu da reação de 0,1 mL dos filtrados com 1 mL do reagente de Bradford. A albumina de soro bovino foi usada para preparar uma curva de calibração na faixa de 0,1 a 0,5 mg/mL, a 595 nm.

3.2.5 – Determinação do teor de umidade dos biocatalisadores imobilizados

O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico, por secagem de 250 mg do biocatalisador imobilizado em estufa com circulação forçada de ar, a 105 °C, por 2 horas até peso constante, segundo metodologia do Instituto Adolfo Lutz.

3.2.6- Rendimento da Imobilização (%)

O rendimento (%) da lipase imobilizada na sílica e na membrana de fibra oca de poliétersulfona ativadas com glutaraldeído e sem ativação foi calculado conforme a equação abaixo, descrita por SOARES *et al.* (1999):

$$RI(\%) = \frac{U_{ADS}}{U_o} \times 100 \quad (\text{Eq. 11})$$

U_{ADS} = unidade de atividade enzimática total presente no suporte (Atividade x massa seca);

U_o = unidade de atividade inicial da enzima livre.

3.2.7 – Propriedades catalíticas da lipase pré-purificada e do biocatalisador imobilizado

3.2.7.1 – Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática

O efeito do pH sobre a atividade enzimática da lipase parcialmente purificada e do biocatalisador imobilizado foi determinado conforme descrito no item 3.2.3, variando-se os tampões como segue: Tampão acetato de sódio 0,2 M pH 2,0, 3,0 4,0 e 5,0; tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 6,0, 7,0 e 8,0 e tampão Tris-HCl 0,2 M pH 9,0, 10,0 e 11,0.

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi realizado conforme descrito no item 3.2.3 no tampão que promoveu maior atividade hidrolítica, utilizando-se as seguintes temperaturas: 30, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 70 e 80 °C.

3.2.7.2 – Estabilidade em pH

A estabilidade em diferentes pHs foi determinada através da incubação de 10 mg da lipase parcialmente purificada e 250 mg do biocatalisador imobilizado (em sílica) à temperatura de 37°C, nos tampões pH 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 e pH 4,0, 6,0 e 11,0, respectivamente. Nos tempos 05, 15, 30, 60, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos foram retiradas amostras para a dosagem da atividade hidrolítica conforme descrito no item 3.2.3.

3.2.7.3 – Estabilidade térmica

Os experimentos de estabilidade térmica foram realizados através da incubação de 10 mg da lipase parcialmente purificada em tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 4,0, nas temperaturas de 30, 37 e 45°C e 250 mg de biocatalisador imobilizado em tampão tris-HCl 0,2 M, pH 11,0, nas temperaturas de 37, 50 e 60 °C. Nos tempos de 05, 15, 30, 60, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos, foram retiradas amostras para a dosagem da atividade hidrolítica conforme descrito no item 3.2.3.

A constante de inativação térmica e o tempo de meia-vida foram calculados pelas equações 12 e 13, respectivamente.

$$A_{in} = A_{ino} \exp(-k_d \cdot t) \quad (\text{Eq.12})$$

$$t_{1/2} = \ln 0,5 / -k_d \quad (\text{Eq.13})$$

Onde:

A_{in} = atividade residual após tratamento térmico durante um certo período de incubação (U);

A_{ino} = atividade enzimática inicial (U);

k_d = constante de desativação (h^{-1});

$t_{1/2}$ = tempo de meia-vida (h).

3.2.7.4 – Cinética enzimática : Determinação dos parâmetros K_m e $V_{m\acute{a}x}$

Para a determinação dos parâmetros K_m (constante de Michaelis-Menten) e $V_{m\acute{a}x}$ (velocidade máxima), variou-se a concentração de azeite de oliva de 1 a 70% utilizado na reação para a determinação da atividade hidrolítica (conforme descrito no item 3.2.3), mantendo-se o percentual de 7% de goma arábica em relação à água. Os parâmetros K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para a enzima livre e imobilizada nos suportes foram calculados no programa GraphPad Prism, versão 5.0.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Avaliação do potencial de imobilização da lipase parcialmente purificada em sílica e em membrana de fibra oca de poliétersulfona

4.1.1 – Determinação da concentração de glutaraldeído para ativação dos suportes

Inicialmente, a membrana de fibra oca de poliétersulfona foi ativada com soluções de glutaraldeído nas concentrações de 1,0; 2,5 e 5% conforme metodologia descrita no item 3.2.2.2, com o objetivo de determinar a concentração que permitisse uma maior imobilização da lipase parcialmente purificada. Os resultados foram apresentados em função do rendimento de imobilização conforme a figura 21.

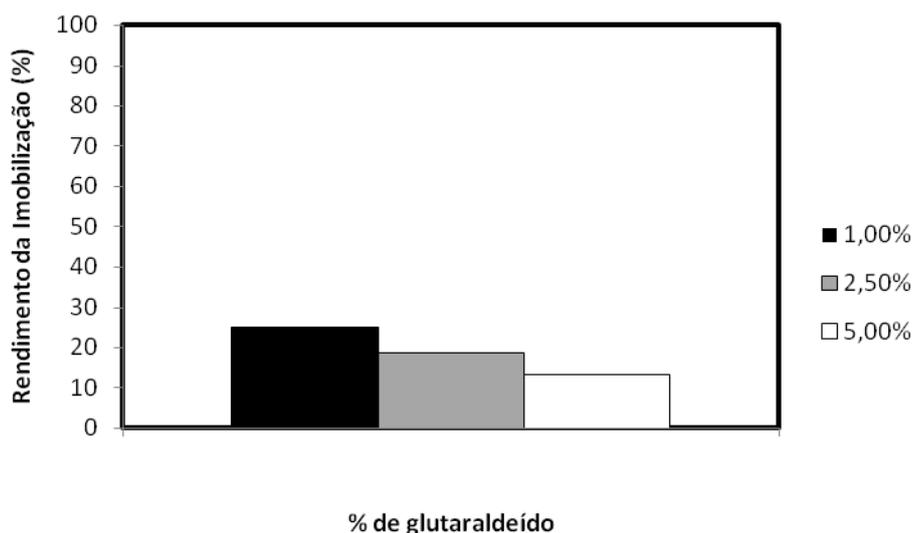


Figura 21: Rendimento de imobilização da lipase parcialmente purificada em membranas de poliétersulfona ativadas com diferentes concentrações de glutaraldeído (% , v/v).

Quando as membranas foram ativadas com glutaraldeído nas concentrações de 1,0%, 2,5% e 5,0% obteve-se os rendimentos de imobilização de respectivamente 25,0%, 18,68% e 13,27%. Isto pode estar associado ao fato de que concentrações maiores de glutaraldeído podem inativar a enzima pelo aumento do número de interações existentes entre os grupos aldeídos presentes na superfície do suporte ativado

e a enzima, o que provocaria uma mudança na conformação enzimática e a consequente perda de atividade (YE *et al.*, 2005; ROMDHANE *et al.*, 2010). Portanto, dentre as concentrações de glutaraldeído testadas, a solução com 1% foi selecionada para a ativação tanto das membranas como da sílica.

4.1.2 – Rendimento de imobilização da lipase parcialmente purificada em sílica e em membranas de fibra oca de poliétersulfona

Para determinar o potencial de imobilização dos suportes, a sílica e a membrana de fibra oca de poliétersulfona (PES) foram submetidas a dois métodos de imobilização: por adsorção física (com suportes não ativados) e por ligação covalente (com suportes ativados). Os resultados obtidos estão demonstrados no gráfico da figura 22.

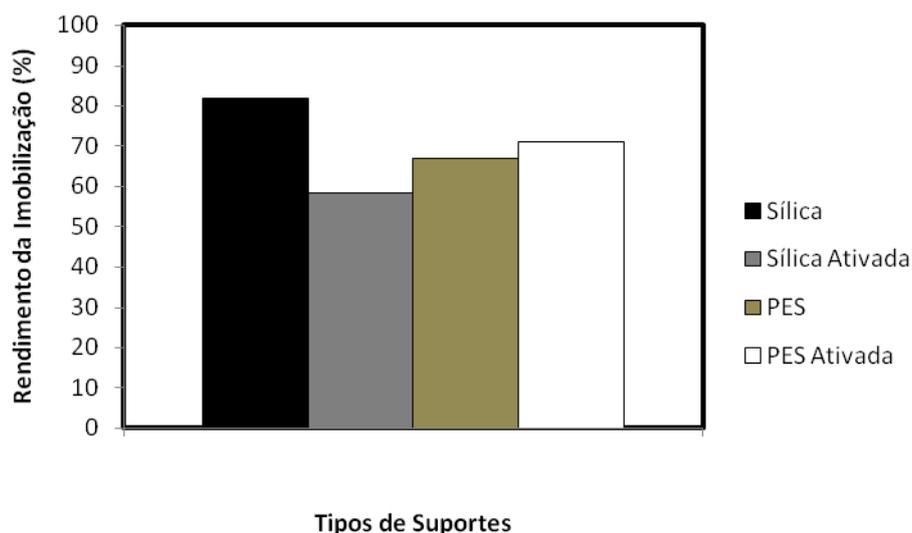


Figura 22: Determinação do suporte com maior potencial de imobilização.

Os rendimentos de imobilização para a sílica, PES, sílica ativada e PES ativada foram de 81,85%; 66,94%; 58,19% e 70,97%, respectivamente. As diferenças encontradas entre os suportes podem ser provavelmente atribuídas a fatores tais como: método de imobilização, tipo do suporte, tipo de interação entre a enzima e o suporte.

O rendimento de imobilização em sílica, obtido neste trabalho foi maior do que o obtido por Soares *et al.*, (2004a), que encapsularam lipase de *Candida rugosa* em matriz sol-gel e obtiveram rendimento de 13,98%; Yadav *et al.*, (2005) imobilizaram

lipase de *Candida antarctica*, *Pseudomonas cepacia* e *Candida rugosa* em sílica e obtiveram rendimentos de 62,2%; 48,5% e 54,7%, respectivamente; e inferior ao valor determinado por Paula *et al.* (2008) que imobilizaram lipase de *Candida rugosa* por adsorção em matriz híbrida de polissiloxano-polivinilálcool a partir da técnica sol-gel e obtiveram rendimento de imobilização de 96,5%.

4.2 – Caracterização bioquímica da lipase parcialmente purificada e do biocatalisador imobilizado (BI)

4.2.1 – Efeito do pH

O efeito do pH na atividade hidrolítica da lipase parcialmente purificada e do BI foi determinado à temperatura de 37 °C, na faixa de pH de 2,0 a 11,0. A atividade hidrolítica foi expressa em termos de atividade relativa e os resultados estão apresentados no gráfico da figura 23.

A lipase parcialmente purificada apresentou, em termos de atividade, comportamento ascendente do pH 2,0 ao 4,0, porém, a partir do pH 4,0 houve um decréscimo na atividade seguido de estabilidade no pH 10 e 11. Em pH 4,0 a lipase parcialmente purificada apresentou 100% de atividade, sendo assim caracterizada como acídica. A menor atividade relativa (em torno de 20%) foi em pH 2,0 indicando que em pHs muito ácidos a enzima apresenta uma tendência à inativação, o que pode ser causada pelo excesso de íons H⁺. A atividade hidrolítica relativa do BI aumentou com o pH, atingindo valor máximo de 100% na faixa de pH entre 10,0 e 11,0. Essa diferença entre o pH ótimo da lipase parcialmente purificada e do BI se deve provavelmente ao processo de imobilização que pode ter provocado mudanças conformacionais na estrutura tridimensional enzimática (GOMES *et al.*, 2006; SIMÕES *et al.*, 2010). No pH 2,0 o BI foi totalmente inativado (atividade relativa= 0%), o que pode provavelmente ter ocorrido pelo excesso de íons H⁺.

Segundo Balcão *et al.*, (1996), em reações enzimáticas da lipase parcialmente purificada com o substrato (triglicerídeos), é necessário que a histidina doe um próton para que haja a quebra dos triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos, uma vez que o ataque nucleofílico da serina (no carbono do grupo carbonila do triglicerídeo) é auxiliado pelo caráter básico da histidina. Quando a reação se processa em meios

ácidos, a serina e a histidina ficam protonadas e a formação do complexo acil-enzima e, conseqüentemente, a formação do produto ficam comprometidos, resultando em menor atividade hidrolítica. Em meio básico a reação é favorecida, já que os grupos hidroxila (OH) do suporte, assim como os grupos hidroxila (OH) da enzima atacam os hidrogênios ionizáveis presentes no meio reacional, diminuindo assim a sua concentração e deslocando o pH da lipase livre para valores mais alcalinos no BI (BALCÃO *et al.*, 1996).

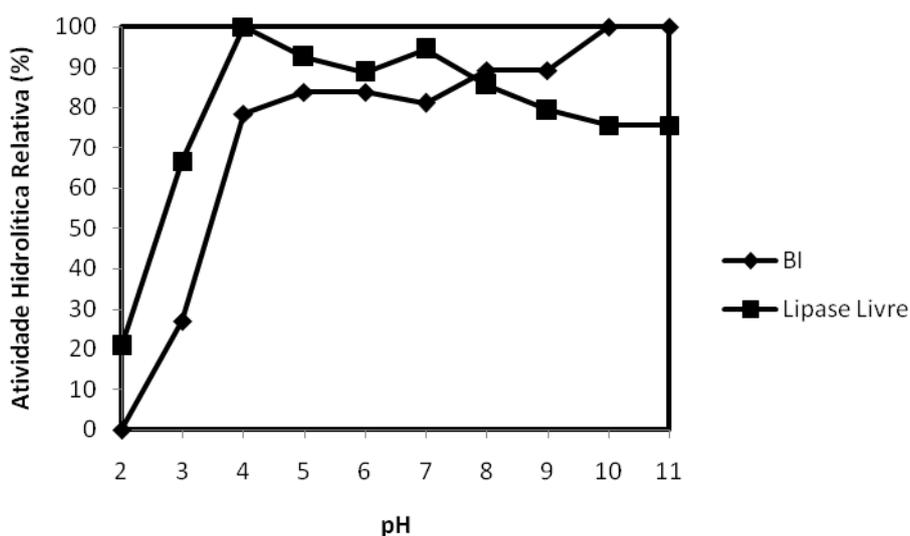


Figura 23: Efeito do pH na atividade relativa da lipase parcialmente purificada e do biocatalisador imobilizado à 37 °C.

Os resultados obtidos para a lipase parcialmente purificada foram similares aos obtidos por Namboordiri & Chattopadhyaya (2000), Mahadik *et al.* (2002) e Mhetras *et al.* (2009) os quais produziram lipase de *Aspergillus niger* com pH ótimo de 5,0 a 6,0 (a partir de fermentação submersa de azeite de oliva), de 2,5 a 3,0 (a partir de farelo de trigo) e de 2,5 (a partir de fermentação submersa de meio sintético), respectivamente.

O pH ótimo do BI foi superior aos obtidos por Salis *et al.*, 2005 e Kim *et al.*, 2006, cujos pHs ótimos foram de 6,0 e 9,0 para a lipase de *Mucor javanicus* imobilizada em sílica por adsorção e por ligação covalente, respectivamente.

4.2.2 – Efeito da temperatura

A influência da temperatura na atividade hidrolítica foi determinada em pH 4,0 (pH ótimo) para a lipase parcialmente purificada e em pH 11,0 para o BI, e expressa em termos de atividade relativa, como demonstrado no gráfico da Figura 24.

Na temperatura de 30°C a lipase parcialmente purificada manteve cerca de 50% de sua atividade, enquanto que na temperatura de 37 °C manteve 100% de atividade. Portanto a temperatura ótima para a atividade da lipase parcialmente purificada foi de 37°C, e à medida que a temperatura foi aumentada observou-se a diminuição da atividade hidrolítica. Por outro lado, o BI apresentou atividade hidrolítica relativa máxima em 50 °C e manteve-se em torno de 80% nas temperaturas posteriores. Isto pode ter ocorrido porque a ligação entre a enzima e o suporte protege a enzima da desnaturação térmica (GOMES *et al.*, 2006; SIMÕES *et al.*, 2010).

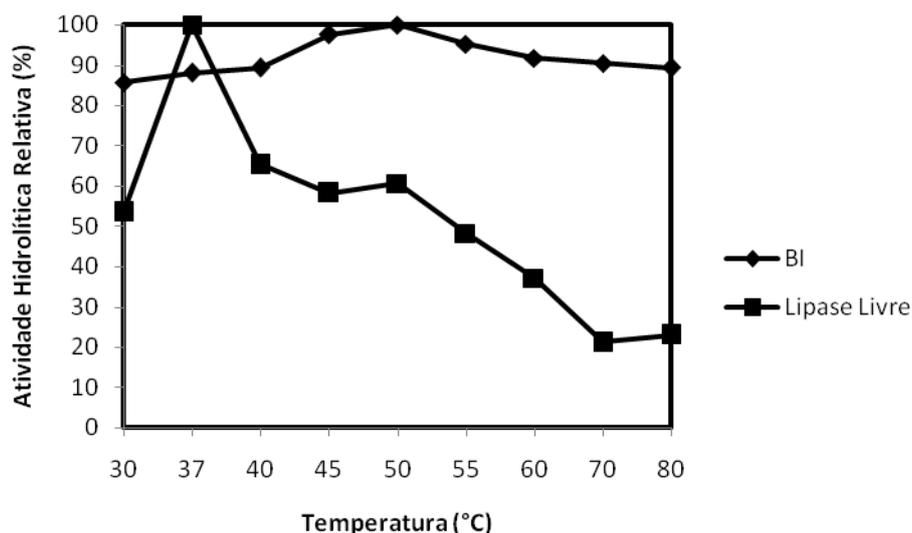


Figura 24: Efeito da temperatura na atividade relativa da lipase parcialmente purificada e do biocatalisador imobilizado.

O aumento da temperatura do meio reacional geralmente aumenta a velocidade das reações catalisadas por lipases, por aumentar o número de colisões entre as moléculas dos reagentes. Entretanto, o aumento da temperatura também eleva a velocidade da desativação térmica, resultando na quebra de ligações da estrutura

enzimática (pontes de hidrogênio, ligações dissulfeto e interações hidrofóbicas), com a conseqüente redução da atividade hidrolítica da enzima livre. O processo de imobilização, por sua vez, proporciona à lipase uma conformação mais rígida. Por isso, o efeito de elevadas temperaturas sobre a quebra das interações responsáveis pela manutenção da estrutura tridimensional enzimática é menos notório (BALCÃO *et al.*, 1996).

Os resultados da lipase parcialmente purificada foram similares aos obtidos por Kamini *et al.* (1998), os quais produziram lipase de *Aspergillus niger*, através da FES de torta de sésamo e obtiveram temperatura ótima de 37°C, Namboordiri & Chattopadhyaya (2000) produziram lipase de *Aspergillus niger* por fermentação submersa de óleo de oliva e obtiveram temperatura ótima na faixa de 35 a 55 °C, Saxena *et al.* (2003) utilizaram o *Aspergillus carneus* para produzir lipase através da fermentação submersa de óleo de girassol e encontraram temperatura ótima de 37 °C e Ohnishi *et al.* (1994) produziram lipase de *Aspergillus oryzae*, através da fermentação submersa de óleo de soja, cuja atividade máxima foi na faixa de temperatura de 28 °C a 30 °C.

A temperatura ótima do BI (50 °C) foi inferior à determinada por Soares *et al.*, (2006), que encapsularam a lipase de *Candida rugosa* em sílica sol-gel, cuja temperatura ótima foi 65 °C; e superior à temperatura ótima determinada por Cruz *et al.*, (2009) que imobilizaram a lipase B de *Candida antarctica* por adsorção em um suporte contendo sílica a 90% e obtiveram temperatura ótima de 40 °C.

4.2.3 – Estabilidade da lipase parcialmente purificada e do BI em diferentes pHs

A estabilidade da lipase parcialmente purificada nos pHs 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 e do BI nos pHs 4,0, 6,0 e 11,0 foi determinada na temperatura de 37 °C, durante 240 minutos. As atividades hidrolíticas da lipase parcialmente purificada e do BI foram expressas em atividade relativa e estão representadas, respectivamente, nos gráficos da Figuras 25 e 26.

Dentre os pHs testados, a lipase parcialmente purificada apresentou maior perda de atividade hidrolítica em pH 4,0, atingindo cerca de 60% da atividade em 240 minutos. A lipase parcialmente purificada demonstrou maior estabilidade em pHs mais próximos à neutralidade, mantendo cerca de 90% e 80% de sua atividade nos pHs 6,0 e

7,0. Durante 30 minutos de incubação, a lipase parcialmente purificada manteve 100% de atividade em pH 6,0.

Os pesquisadores têm produzido lipase de *Aspergillus niger* com estabilidade em faixas variadas de pHs: entre 4,0 e 10,0 por 30 min à 30 °C (KAMINI *et al.*, 1998); entre 5,0 e 7,5, por 1 h à 37 °C (NAMBOORDIRI & CHATTOPADHYAYA, 2000); entre 2,5 e 9,0 por 24 h em temperatura ambiente (MAHADIK *et al.*, 2002); entre 8,0 e 11,0 por 24 h à 30 °C (MHETRAS *et al.*, 2009).

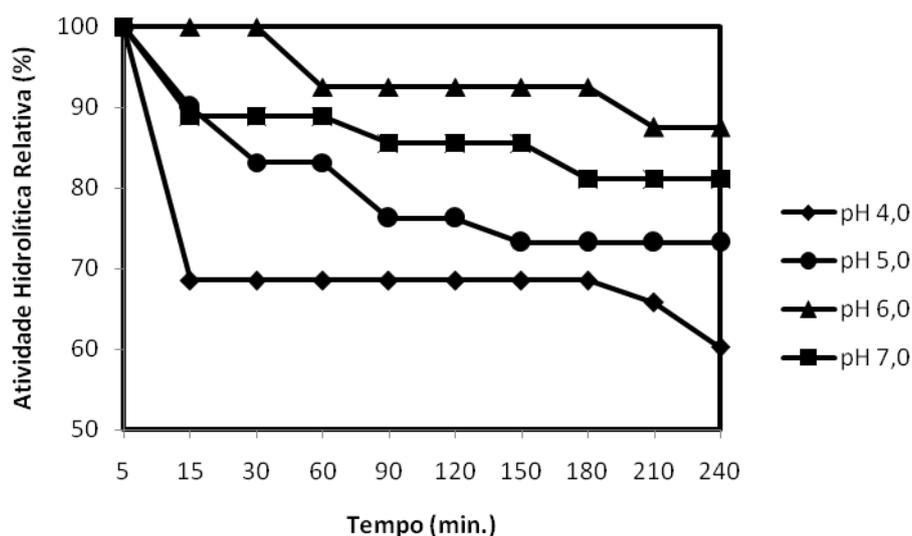


Figura 25: Estabilidade em diferentes pHs da lipase parcialmente purificada de *Aspergillus niger*.

O BI foi mais estável em pH 11,0, mantendo 100% de atividade durante 150 minutos de incubação, e atingindo cerca de 95% de atividade em 240 minutos. A atividade do BI nos pHs 4,0 e 6,0, foi de cerca de 90%, enquanto que para a lipase parcialmente purificada foi em torno de respectivamente, 60% e 90%, em 240 minutos. Percebe-se que a imobilização aumentou a estabilidade da enzima em pH 4,0, e manteve a atividade em pH 6,0.

O BI apresentou estabilidade em pH em tempos muito inferiores ao obtido por Chaubey *et al.*, (2006), que imobilizaram a lipase de *Arthrobacter* sp. por ligação covalente em sílica gel apresentando estabilidade nos pHs 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0 por 48 horas e encapsularam em sol-gel tratado com γ -ATPS e ativado com glutaraldeído apresentando estabilidade nos pHs 7,0 e 8,0 por 96 horas.

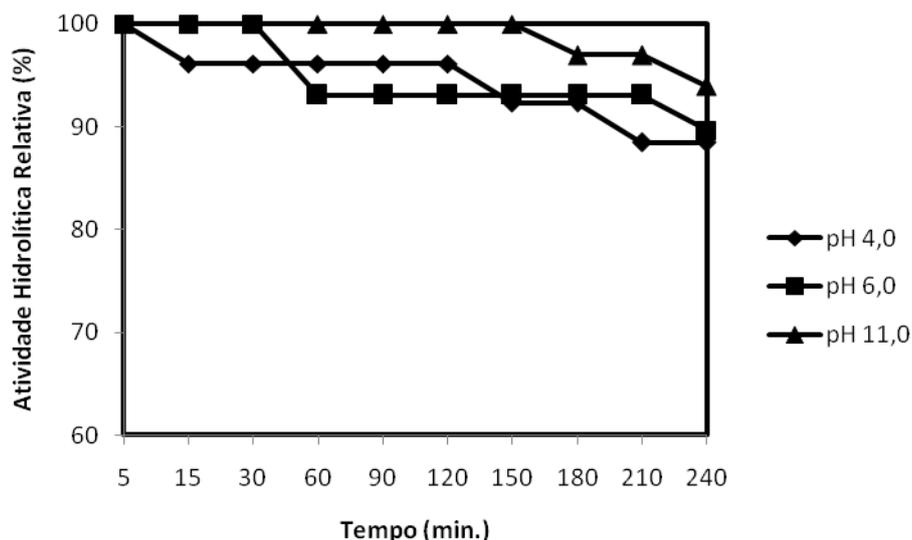


Figura 26: Estabilidade em diferentes pHs do biocatalisador imobilizado.

4.2.4 – Estabilidade térmica da lipase pré-purificada e do BI

A estabilidade térmica da lipase parcialmente purificada foi determinada no pH 4,0 nas temperaturas de 30, 37 e 45°C, por 240 minutos, enquanto que a estabilidade térmica do BI foi determinada em pH 11,0 nas temperaturas de 37, 50 e 60 °C. As Figuras 27 e 28 representam a atividade hidrolítica relativa (%) da lipase parcialmente purificada e do BI, respectivamente, em cada temperatura durante o tempo de incubação.

A estabilidade térmica diminuiu com o aumento da temperatura do meio reacional, tanto para a lipase parcialmente purificada como para o BI. Nas temperaturas de 30°C, 37°C e 45°C, a lipase parcialmente purificada manteve sua atividade em torno de 85%, 70% e 60% em 240 minutos de incubação, respectivamente. Isso quer dizer que temperaturas próximas da temperatura ambiente danificam menos a estrutura enzimática, mantendo-a estável por um maior período de incubação. Nas temperaturas de 37, 50 e 60 °C, o BI apresentou atividade em torno de 95%, 80% e 70%.

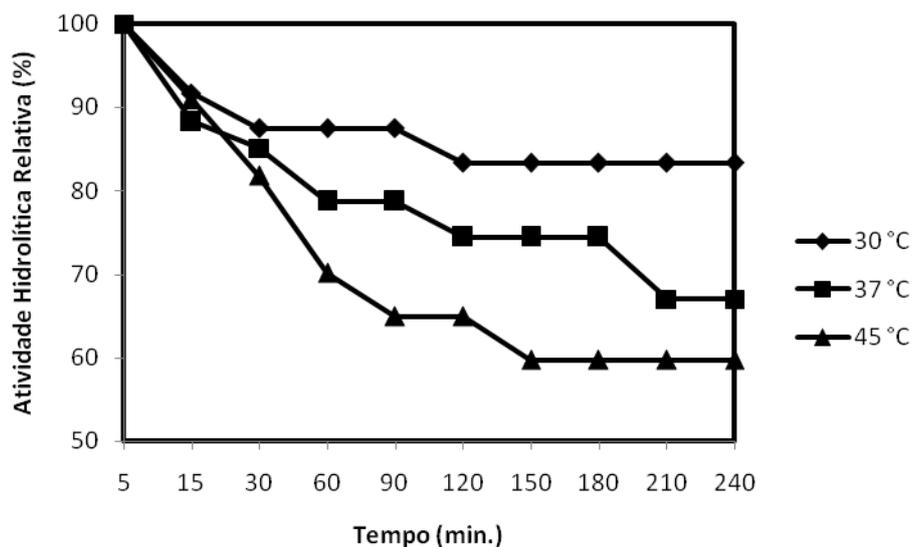


Figura 27: Estabilidade térmica da lipase parcialmente purificada de *Aspergillus niger*

As lipases de *Aspergillus niger* relatadas na literatura têm apresentado estabilidade térmica em diferentes faixas de temperatura e tempos de incubação: 4 a 50 °C por 30 minutos (KAMINI *et al.*, 1998); 20 a 50 °C por 1 hora (NAMBOORDIRI & CHATTOPADHYAYA, 2000); 50 a 60 °C por 5 horas (MAHADIK *et al.*, 2002) e 40 °C por 3 horas (MHETRAS *et al.*, 2009).

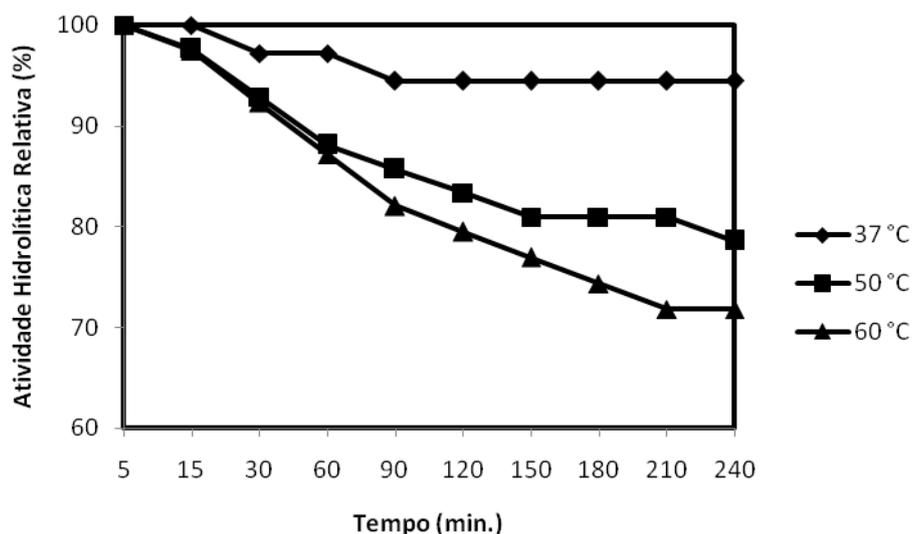


Figura 28: Estabilidade térmica do biocatalisador imobilizado.

A lipase parcialmente purificada apresentou, em 240 minutos de incubação, cerca de 70% de atividade, à 37 °C, enquanto que para o BI, nas mesmas condições, esse valor ficou em torno de 95%, o que implica dizer que o processo de imobilização realmente aumenta a estabilidade da enzima, provavelmente, por proteger a estrutura tridimensional enzimática do efeito negativo das altas temperaturas (GOMES *et al.*, 2006; SIMÕES *et al.*, 2010).

A estabilidade térmica dos biocatalisadores imobilizados depende principalmente da fonte de produção da lipase. Há na literatura estabilidades térmicas variadas: 40 °C por 1 hora para a lipase de *Arthrobacter* sp. imobilizada por ligação covalente em sílica gel e encapsulada em sol-gel tratado com γ -ATPS e ativado com glutaraldeído (CHAUBEY *et al.*, 2006); 50 °C por 2 horas para a lipase de *Mucor javanicus* imobilizada em sílica por ligação covalente (KIM *et al.*, 2006); 37 a 45 °C por 420 minutos para a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em sílica sol-gel (SOARES *et al.*, 2006).

O conhecimento da estabilidade térmica é de extrema importância para a aplicação das enzimas em processos industriais. Na tabela 8 estão demonstrados os valores das constantes de inativação térmica e o tempo de meia vida da lipase parcialmente purificada e do BI, respectivamente, calculadas a partir das equações 8 e 9. O tempo de meia-vida é o tempo necessário para reduzir a atividade enzimática à metade do valor inicial (RÓS *et al.*, 2010).

Tabela 8: Constante de inativação térmica e tempo de meia-vida para a lipase parcialmente purificada.

	Temperatura (°C)	Constante de inativação térmica (K_d) (h^{-1})	Tempo de meia vida ($t_{1/2}$) (h)
Lipase parcialmente purificada	37	0,10	6,93
BI	37	0,014	48,51

À medida que a temperatura do meio reacional aumenta, aumentam as colisões entre as moléculas dos reagentes. Com isso, a velocidade da inativação térmica

aumenta, acarretando na redução do tempo de meia vida da enzima e na diminuição de sua estabilidade térmica (LIMA & ANGNES, 1999; SCHWAAB & PINTO, 2007).

À 37 °C, a lipase parcialmente purificada apresentou tempo de meia vida de 6,93 horas, enquanto que o BI apresentou valor superior em cerca de sete vezes (48,51 horas). Quanto menor o valor K_d melhor a estabilidade térmica, logo o BI apresentou maior estabilidade térmica do que a lipase parcialmente purificada. Esses resultados confirmam o efeito positivo do processo de imobilização sobre a estabilidade térmica da lipase.

4.2.5 – Determinação dos parâmetros cinéticos da lipase parcialmente purificada e do BI

O efeito da concentração do substrato, na cinética da reação catalisada pela lipase parcialmente purificada e pelo BI, foi determinado pela hidrólise do azeite de oliva, à 37 °C, em pH 4,0 e 11,0, respectivamente, conforme descrito no item 3.2.7.4.

A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima da reação ($V_{máx}$) foram calculadas pelas correlações lineares de Lineweaver-Burk, Hanes e Eadie-Hofstee (tabela 9). Dentre elas, a de Hanes-Wolf apresentou uma melhor correlação linear tanto para a lipase parcialmente purificada ($R^2 = 0,925$) como para o BI ($R^2 = 0,943$), cujas representações estão dispostas nas figuras 29 e 30.

Tabela 9 – Correlações testadas para determinação dos parâmetros cinéticos.

	Lineweaver-Burk	Hanes-Wolf	Eadie-Scatcharel	Wolf-Augustinisson-Hofstee
R^2 (Lipase parcialmente purificada)	0,408	0,925	0,300	0,300
R^2 (BI)	0,091	0,943	0,082	0,082

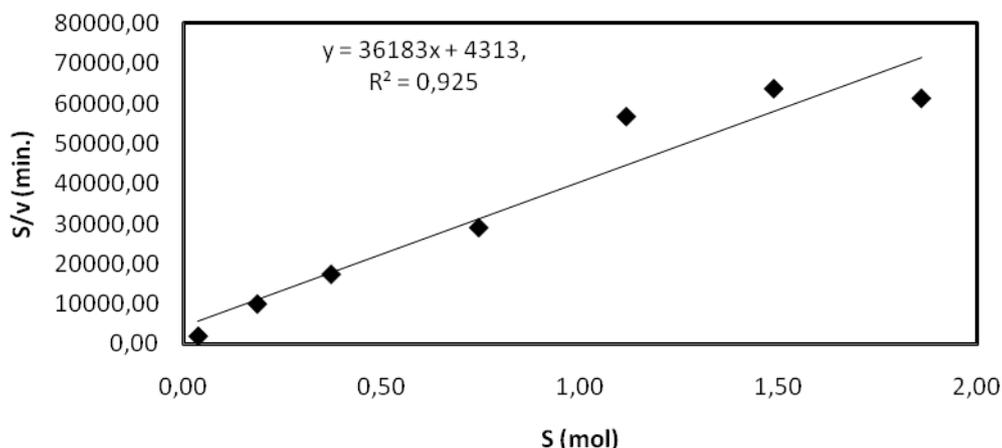


Figura 29: Representação de Hanes-Wolf para a hidrólise do azeite de oliva pela lipase parcialmente purificada.

Em comparação, o valor de K_m da lipase pré-purificada foi maior do que o obtido por Kamini *et al.*, (1998), os quais produziram lipase, através da FES da torta de sésamo pelo *Aspergillus niger* e obtiveram K_m de 4,55 mmol.

Elevados valores de K_m significam baixa afinidade pelo substrato, ou seja, maior é a concentração do substrato necessária para alcançar a metade da velocidade máxima (GUPTA *et al.*, 2010). O valor de K_m da lipase parcialmente purificada (119,0 mmol) foi menor do que o do BI (130,1 mmol), o que significa dizer que a afinidade da lipase parcialmente purificada pelo substrato foi maior do que a afinidade da enzima na forma imobilizada. O valor de $V_{m\acute{a}x}$ obtido para a lipase parcialmente purificada (0,028 U/ mg) foi maior do que o do BI (0,020 U/ mg).

A baixa afinidade do BI pelo substrato, assim como a redução no valor de $V_{m\acute{a}x}$ podem ter ocorrido por mudanças conformacionais na estrutura tridimensional enzimática, devido ao processo de imobilização, ou ainda devido à menor acessibilidade do substrato ao sítio ativo enzimático do BI.

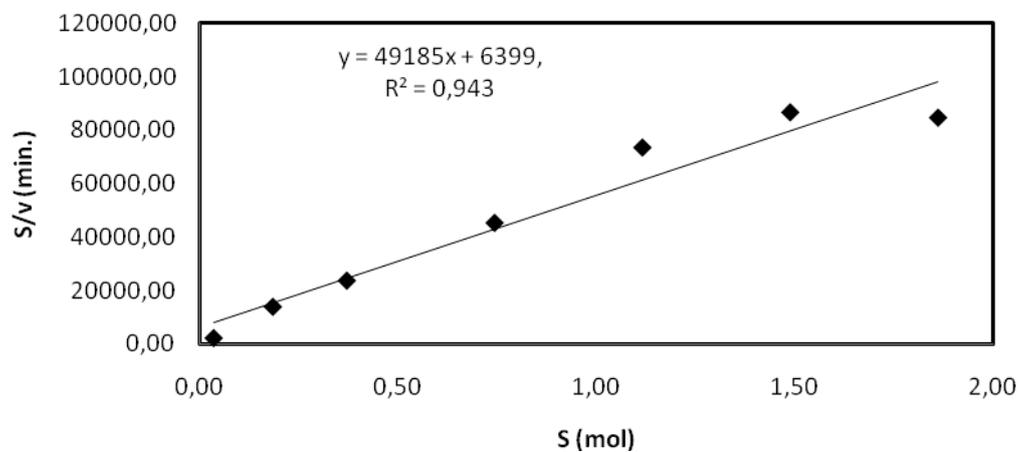


Figura 30: Representação de Hanes-Wolf para a hidrólise do azeite de oliva pelo BI.

A lipase de *Candida rugosa* imobilizada por Simões *et al.*, (2010) em suporte híbrido de sílica-quitosana apresentou menor afinidade pelo substrato ($K_m = 851$ mmol) e uma menor velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x} = 0,001409$ U/ mg) do que o BI.

5 – CONCLUSÃO

A lipase parcialmente purificada obtida a partir da fermentação da farinha de sementes de abóbora com o fungo *Aspergillus niger* foi imobilizada em matrizes hidrofóbicas (sílica e membranas de poliétersulfona) e caracterizada bioquimicamente. A adsorção física da enzima em sílica foi o método que proporcionou maior rendimento de imobilização (81,85%). A enzima livre apresentou máxima atividade hidrolítica em pH 4,0, caracterizando-a como acídica, e em temperatura de 37 °C. Apesar disto, apresentou maior estabilidade em pH 6,0 e na temperatura de 30 °C. Já o biocatalisador imobilizado apresentou máxima atividade hidrolítica em pH 11,0 e temperatura de 50°C e apresentou estabilidade nos pHs 4,0, 6,0 e 11,0 à 37 ° C por 4 horas. Em relação à cinética enzimática, o BI apresentou menor velocidade máxima de reação e menor afinidade pelo substrato (caracterizada por maior valor da constante de Michaelis Menten) do que o obtido pela enzima livre. Os parâmetros cinéticos e a caracterização bioquímica servirão como base para aplicações futuras da lipase na forma livre ou imobilizada em sílica, em processos de interesse industrial.

CONCLUSÃO GERAL

A farinha de sementes de abóbora apresentou neste estudo potencial como substrato para a produção da lipase obtida a partir de *Aspergillus niger*. Na fermentação em estado sólido (FES) a temperatura e a umidade inicial do resíduo foram os parâmetros que influenciaram significativamente e de forma positiva o processo, ou seja, quanto maior a interação destes parâmetros maior foi a produção de enzima. A partir dos resultados obtidos no processo fermentativo, pôde-se concluir que os objetivos inicialmente propostos quanto à produção da enzima foram alcançados, obtendo-se atividade de 71,88 U/g seca. Tal atividade é de extrema importância para o desenvolvimento de novas rotas de processo, para obtenção de produtos novos ou conhecidos a custos mais competitivos, ampliando simultaneamente, o potencial de aplicação das enzimas em processos industriais. E neste caso, na biocatálise um dos maiores obstáculos na competição deste processo com a prática corrente da síntese química são: o alto custo dos biocatalisadores e sua baixa estabilidade operacional. Portanto, o uso industrial de enzimas como catalisadores depende da eficiência de sua imobilização e do emprego de suportes adequados. Com base na necessidade do mercado, na segunda etapa do trabalho optou-se pela utilização de duas matrizes hidrofóbicas como suportes (membrana de fibra oca de poliétersulfona e sílica obtida pela técnica sol-gel) e dois métodos de imobilização (adsorção física e ligação covalente). Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, e nesse conjunto de dados pôde-se concluir que a adsorção física da enzima em sílica foi o método que proporcionou maior rendimento de imobilização (81,85%). Portanto, a grande contribuição deste trabalho foi o desenvolvimento de um biocatalisador que, poderá substituir com sucesso, os processos químicos convencionais após avaliação destes biocatalisadores produzidos em diferentes biorreatores, os quais serão objeto de estudos futuros.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar o potencial de diferentes resíduos e de diferentes microrganismos para a produção de lipase, bem como testar a influência de indutores;
- Testar métodos para purificação da enzima produzida;
- Caracterizar a enzima livre e imobilizada com relação à estabilidade operacional e à estocagem, ao efeito de íons e de diferentes solventes;
- Avaliar o potencial da enzima livre e imobilizada para a obtenção de compostos de interesse na área de alimentos, como por exemplo, ésteres de ácido ascórbico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABUD, A. K de S.; NARAIN, N. Incorporação da farinha do resíduo do processamento de polpa de fruta em biscoitos: uma alternativa de combate ao desperdício. *Braz. J. Food Technol.*, vol. 12, n°4, p. 257-265, Out/Dez., 2009.

AÇIKEL, U.; ERSAN, M.; AÇIKEL, Y. S. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. *Food and Bioproducts Processing*, v. 88, p. 31-39, 2010.

ADAMCZAK, M.; BORNSCHEUER, U.T. Improving ascorbyl oleate synthesis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids and water activity control by salt hydrates. *Process Biochemistry*, v. 44, p.257–261, 2009.

ADAMCZAK, M.; BORNSCHEUER, U.T.; BEDNARSKI, W. Synthesis of ascorbyloleate by immobilized *Candida antarctica* lipases. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3177–3180, 2005.

AIDOO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, B. J. B. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 12, p. 6-9, 1981.

ALCÂNTARA, S. R.; ALMEIDA, F. de A. C. de; SILVA, F. L. H. da. Emprego do bagaço seco do pedúnculo de caju para posterior utilização em um processo de fermentação semi-sólida. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 9, n° 2, p. 137-142, 2007.

ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biosensores. *Química Nova*, v. 25, n° 5, Sept/Oct, 2002.

APPLEQUIST, W. L.; AVULA, B.; SCHANEBERG, B. T.; WANG, Yang-Hong; KHAN, I. A. Comparative fatty acid content of seeds of four Cucurbita species grown in a common (shared) garden. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, p. 606–611, 2006.

AQUINO, L. C. L.; DANTAS, E. M. Fermentação em Estado Sólido de Resíduos Agroindustriais para a Obtenção de Lipase Microbiana. *Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Natal-RN, 2009.

AQUINO, L.C.L.; DANTAS, E. M.; SANTOS, M. C. Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a obtenção de lipase microbiana. *Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, Recife-PE, 2008.

ARAGÃO, V. C.; ANSCHAU, A.; PORCIUNCULA, B. D. A.; THIESEN, C.; KALIL, S. J.; BURKET, C. A. V.; BURKET, J. F. de M. Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. *Quím. Nova*, v. 32, n° 9, 2009.

ARROYO, M.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V. Stabilization of lipase B from *Candida antarctica* by immobilization on different supports. *Stability and stabilization of biocatalysts*, p. 565-570, 1998.

BADRUDDIN, S.; SIDEK, H.; BURHAM, H.; RASHEED, R.A.G.A.; NOOR, N.M.; Enzymatic synthesis of palm-based ascorbyl esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 58, p.153–157, 2009.

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

BAYINDIRLI, A. Enzymes in Fruit and vegetable processing: chemistry and engineering applications. *Taylor and Francis Group*. New York, 2010.

BAYRAMOGLU, G; KAÇAR, Y; DENIZLI, A.; ARICA, M.Y. Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic group incorporated poly(2-hydroxyethyl

methacrylate) based hydrophilic membrane matrix. *Journal of Food Engineering*, v.52, p.367–374, 2002.

BEEKSOW, T.C., KUSHARYOTO, W., ANSPACH, F.B., KRONER, K.H., DECKWER, W.D. Surface modification of microporous polyamide membranes with hydroxyethyl cellulose and their application as affinity membranes. *Journal of Chromatography A*, v.715, p. 49-65, 1995.

BELMIRO, T. M. C.; QUEIROZ, A. J. de M.; FIGUEIREDO, R. M. F. de.; FERNANDES, T. K. S.; BEZERRA, M. da C. T. Alterações químicas e físico-químicas em grãos de abóbora durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 14, nº9, 2010.

BEUX, M. R.; SOCCOL, C. R. Microbiota isolada durante as fases de pré e pós colheita dos grãos de café associada à qualidade e sanidade da bebida. *B. CEPPA*, Curitiba, v. 22, nº 1, p. 155-172, 2004.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, v. 76, p. , 2008.

BITENCOURT, C. C.; PEREIRA, E. B. Síntese de ésteres formadores de aromas empregando lípases imobilizadas em quitosana por adsorção física. *Rev. de Iniciação Científica*, vol. 4, nº 1, 2006.

BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; OTERO, C.; DIAZ-GONZALEZ, G. Functionalization of mesoporous sílica for lipase immobilization: Characterization of the support and the catalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 30, p. 83-93, 2004.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Editora Interciência. 2008.

BORGES, S. V.; BONILHA, C. do C.; MANCINI, M. C. Sementes de jaca (*artocapus integrifolia*) e de abóbora (*curcubita moschata*) desidratadas em diferentes temperaturas e utilizadas como ingredientes em biscoitos tipo cookie. *Alim. Nutr.*, v.17, n.3, p.317-321, jul./set., 2006.

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

BURHAM, H.; RASHEED, R. A. G. A.; NOOR, N. Md.; BADRUDDIN, S.; SIDEK, H. Enzymatic synthesis of palma-based ascorbyl esters. *Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 58, p. 153-157, 2009.

BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. Using factorial design. *Bioresource Technology*, v. 91, p. 77-84, 2004.

BUSINESS COMMUNICATIONS COMPANY (BCC). BCC Research Report Indicates Global Market for Industrial Enzymes Worth \$2.7 Billion. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/report/BIO030E.html>> Acesso: 14/11/2009.

CAI, Y.; WANG, L.; LIAO, X.; DING, Y.; SUN, J. Purification and partial characterization of two new cold-adapted lipases from mesophilic *Geotrichum* sp. SYBC WU-3. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 786-790, 2009.

CALDER, M. S.; SIEGEL, D. Properties of the Michaelis-Menten mechanism in phase space. *Journal of Mathematical Analysis and Applications*, v. 339, p. 1044-1064, 2008.

CAMPOS, A. R. N.; SANTANA, R. A. C. de; DANTAS, J. P.; OLIVEIRA, L. de S. C.; SILVA, F. L. H. da. Enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo de caju por cultivo semi-sólido. *Revista de biologia e ciências da terra*, v. 5, nº 2, 2005.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C. de; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Quím. Nova*, v. 32, nº 1, 2009.

CARVALHO, P. de O.; CALAFATTI, S. A. P.; MARASSI, M.; SILVA, D. M. da; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.; MACEDO, G. A. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Quím. Nova*, v. 28, nº 4, São Paulo, Jul/ Agos, 2005.

CARVALHO, P. de O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D'ADDIO; OLIVEIRA, J. G. de; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. da. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Quím. Nova*, v. 26, nº 1, São Paulo, Jan./Feb., 2003.

CARVALHO, N. M. F.; PIRES, B. M.; ANTUNES, O. A. C.; FARIA, R. B.; OSÓRIO, R. E. H. M. B.; PIOVEZAN, C.; NEVES, A. Uso de equações lineares na determinação dos parâmetros de Michaelis-Menten. *Quím. Nova*, v.33, 2010.

CASTILHO, L.R.; DECKWER, W.D.; ANSPACH, F.B. Influence of matrix activation and polymer coating on the purification of human IgG with protein A affinity membranes. *Journal of Membrane Science*, v.172, p.269-277, 2000.

CASTRO, H. F. de; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. dos; AGUIAR, C. L. de. Modificação de oleos e gorduras por biotransformação. *Quím. Nova*, v. 27, nº 1, 2004.

CHANG, S.W.; YANG, C.J.; CHEN, F.Y.; AKOHB, C.C.; SHIEH, C.J., Optimized synthesis of lipase-catalyzed l-ascorbyl laurate by Novozym® 435. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.56, p.7-12, 2009.

CHAUBEY, A.; PARSHAD, R.; KOUL, S.; TANEJA, S. C.; QAZI, G. N. *Arthrobacter* sp. lipase immobilization for improvement in stability and enantioselectivity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 73, p. 598-606, 2006.

CHEN, B.; YIN, C.; CHENG, Y.; LI, W.; CAO, Z. A.; TAN, T. Using silk woven fabric as support for lipase immobilization: the effect of surface hydrophilicity/hydrophobicity on enzymatic activity and stability. *Biomass and Bioenergy*, p. 1-8, 2010.

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

CHUNHUA, Y.; TAO, L.; TIANWEI, T. Synthesis of Vitamin A Esters by Immobilized *Candida* sp. Lipase in Organic Media, Chinese. *J. Chem. Eng.*, v. 14, n.1, p.81-86, 2006.

CHOU, C. C.; RWAN, J. H. Mycelial propagation and enzyme production in koji prepared with *Aspergillus oryzae* on various rice extrudates and steamed rice. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 79, p. 509-512, 1995.

CIAFARDINI, G.; ZULLO, B. A.; IRIDE, A. Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. *Food Microbiology*, v. 23, p. 60-67, 2006.

COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. DE F.; FURTADO, A. A. L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. *B.CEPPA*, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 3342, 2001.

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

CORDOVA, J.; NEMMAOUI, M.; ISMAÏLI-ALAOUI, M; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 5, p. 75-78, 1998.

COSTA, S. A.; TZANOV, T.; PAAR, A.; GUDELJ, M.; GUBITZ, G. M.; CAVACO-PAULO, A. Immobilization of catalases from *Bacillus* SF on alumina for the treatment of textile bleaching effluents. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, p. 815-819, 2001.

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

CRUZ, J. C.; PFROMM, P. H.; REZAC, M. E. Immobilization of *Candida rugosa* lipase B on fumed silica. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 62-69, 2009.

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

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

DAMIANI, C.; VILAS BOAS, E. V. de B.; SOARES JÚNIOR, M.; CALIARI, M.; PAULA, M. do L. de; PEREIRA, D. E. P.; SILVA, A. G. M. Análise física, sensorial e microbiológica de geléias de manga formuladas com diferentes níveis de cascas em substituição à casca. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n° 5, p. 1418-1423, 2008.

DELLA, V. P.; HOTZA, D.; JUNKES, J. A.; OLIVEIRRA, A. P. N. de. Estudo comparativo entre sílica obtida por lixívia ácida da casca de arroz e sílica obtida por tratamento térmico da cinza de casca de arroz. *Química Nova*, v. 29, n° 6, 2006.

DEMIR, B. S.; TUKEL, S. S. Purification and characterization of lipase from *Spirulina platensis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 64, p. 123-128, 2010.

DENG, H.T., XUA, Z.K.; WU, J.; YE, P. ; ZHEN-MEI LIU, Z.M.; SETA, P. A comparative study on lipase immobilized polypropylene microfiltration membranes

modified by sugar-containing polymer and polypeptide. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 28, p.95–100, 2004.

DOBREV, G. T.; PISHTIYSKI, V. S. S.; MIRCHEVA, R. Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design. *Bioresource Technology*, v. 98, p.2671-2678, 2007.

DOELLE, H. W.; MITCHELL, D. A.; ROLZ, C. E. Solid substrate cultivation. *Elsevier Applied Science*, London and New York, 1992.

DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and microbial Technology*, v. 31, p. 907-931, 2002.

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

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

EL-ADAWY, T. A.; TAHA, K. M. Characteristics and composition of different seed oils and flours. *Food Chemistry*, v. 74, p. 47-54, 2001.

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

ELLAIAH, P.; SRINIVASULU, B.; ADINARAYANA, K. Optimisation studies on neomycin production by a mutant strain of *Streptomyces marinensis* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 529–53, 2004b.

FANG, B.; LING, Q.; ZHAO, W.; MA, Y.; BAI, P.; WEI, Q.; LI, H.; ZHAO, C. Modification of polyethersulfone membrane by grafting bovine serum albumin on the surface of polyethersulfone/ poly(acrylonitrile-co-acrylic acid) blended membrane. *Journal of Membrane science*, v. 329, p. 46-55, 2009.

FELLOWS, P. J. Tecnologia do Processamento de Alimentos: princípios e prática. Editora Artmed, 2º ed., Porto Alegre, 2006.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chemistry and Physics of lipids*, v. 93, p. 185-197, 1998.

FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá: aproveitamento das sementes. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 26, nº 1, p. 101-102, Jaboticabal, 2004.

FISHMAN, A., LEVY, I.; COGAN, U.; SHOSEYOV, O. Stabilization of horseradish peroxidase in aqueous-organic media by immobilization onto cellulose using a cellulose-binding-domain. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 18, p. 121-131, 2002.

FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K. M.; RAMACHANDRAN, S.; GHOSH, S.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 15, p. 107-115, 2003.

FUENTES, I. E. de; VISERAS, C. A.; UBIALI, D.; TERRENI, M.; ALCÁNTARA, A. R. Different phyllosilicates as supports for lipases immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, p. 657-663, 2001.

GAN, K. H.; BRUTTINI, R.; CROSSER, O. K.; LIAPIS, A. I. Freeze-drying of pharmaceuticals in vials on trays effects of drying chamber wall temperature and tray side on lyophilization performance. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, v. 48, p. 1675-1687, 2005.

GHAMGUI, H.; MILED, N.; KARRA-CHAÂBOUNI, M.; GARGOURI, Y. Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO₃: a comparative study. *Biochemical and Engineering Journal*, v. 37, p. 34-41, 2007.

GIRELLI, A. M.; MATTEI, E.; MESSINA, A.; PAPALEO, D. Immobilization of mushroom tyrosinase on controlled pore glass: effect of chemical modification. *Sensors and Actuators*, v. 125, p. 48-54, 2007.

GOLICNIK, M. Evaluation of enzyme kinetic parameters using explicit analytic approximations to the solution of the Michaelis-Menten equation. *Biochemical Engineering Journal*, 2010.

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

GOMES, F. M.; PAULA, A. V. de; SILVA, G. dos S.; CASTRO, H. F. de. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. *Química nova*, v. 29, n°4, p. 710-718, 2006.

GOMES, F. M.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F. de. Immobilization of lipase on chitin and its use in nonconventional biocatalysis. *Biomacromolecules*, v. 5, p. 17-23, 2004.

GÓMEZ, J. L.; BÓDALO, A.; GÓMEZ, E.; BASTIDA, J.; HIDALDO, A. M.; GÓMEZ, M. Immobilization of peroxidases on glass beads: an improved alternative for phenol removal. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 1016-1022, 2006.

GONÇALVES, A. M.; SCHACHT, E.; MATTHIJS, G.; BARROS, M. R. A.; CABRAL, J. M. S.; GIL, M. H. Stability studies of a recombinant cutinase immobilized to dextran and derivatized silica supports. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, p. 60-66, 1999.

GUISAN, J. M. Immobilization of Enzymes and Cells. Editora Humana Press, 2° ed., 2006.

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

GUPTA, S.; SINGH, K.; BHATTACHARYA, A. Lipase immobilization on polysulfone globules and their performances in olive oil hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 46, p. 445-450, 2010.

GUPTA, S.; YOGESH; JAVIYA, S.; BHAMBI, M.; PUNDIR, C. S.; SINGH, K.; BHATTACHARYA, A. Comparative study of performances of lipase immobilized asymmetric polysulfone and polyether sulfone membranes in olive oil hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 42, p. 145-151, 2008.

GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 5249-5254, 2009.

HAMIDI-ESFAHANI, Z.; SHOJAOSADATI, S. A.; RINZEMA, A. Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A. niger* growth in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 21, p. 265-272, 2004.

HANEFELD, U.; GARDOSSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilization. *Chemical Society Reviews*, v. 38, p. 453-468, 2008.

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

HATZINIKOLAU, D. G.; KOURENTZI, E.; STAMATIS, H.; CHRISTAKOPOLOUS, P.; KOLISIS, F. N.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. A novel lipolytic activity of *Rhodotorula glutinis* cells: production, partial characterization and application in the synthesis of esters. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 88 , p. 53-56, 1999.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 64, p. 175-186, 2004.

HORCHANI, H.; MOSBAH, H.; SALEM, N. B.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. Biochemical and molecular characterization of a thermoactive, alkaline and detergent-stable from a newly isolated *Staphylococcus aureus* strain. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 56, p. 237-245, 2009.

HUANG, X.J.; GE, D.; XU, Z.K. Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. *European Polymer Journal*, v. 43, p. 3710–3718, 2007.

HUNG, T. C.; GIRIDHAR, R.; CHIOU, S. H.; WU, W. T. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 26, p. 69-78, 2003.

HUMEAU, C.; GIRARDIN, M.; ROVEL, B.; MICLO, A. Enzymatic synthesis of fatty acid ascorbyl esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.5, p.19–23, 1998.

IDA, J. -I.; MATSUYAMA, T.; YAMAMOTO, H. Immobilization of glucoamylase on ceramic membrane surfaces modified with a new method of treatment utilizing SPCP-CVD. *Biochemical Engineering Journal*, v. 5, p. 179-184, 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Inst. Adolfo Lutz. 4ª Ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1018f.

ISHIMOTO, F. Y.; HARADA, A. I.; BRANCO, I. G.; CONCEIÇÃO, W. A. dos S.; COUTINHO, M. R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. var. *flavicarpa* Deg) para produção de biscoitos. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, v. 9, nº 2, p. 279-292, 2007.

JAEGER, K. E.; RANSAK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F. DIJKSTRA, B. W.; FEMS Microbial, Rev. , v. 15, p. 29, 1994.

JEGANNATHAN, K.R.; CHAN, E. -S.; RAVINDRA, P. Physical and stability characteristics of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in k-carrageenan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 58, p. 78-83, 2009.

JI, Q.; XIAO, S.; HE, B.; LIU, X. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 66, p. 264-269, 2010.

JOSÉ, N. M.; PRADO, L. A. S. de A. Materiais híbridos orgânicos-inorgânicos: preparação e algumas aplicações. *Química Nova*, v. 28, nº 2, Mar/ Apr., 2005.

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

KAHRAMAN, M. V.; BAYRAMOGLU, G.; KAYAMAN-APOHAN, N.; GUNGOR, A. α -Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment. *Food Chemistry*, v. 104, p. 1385-1392, 2007.

KARRA-CHÂABOUNI, M.; BOUAZIZ, I.; BOUFI, S.; REGO, A. M. B. do.; GARGOURI, Y. Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: activity and stability studies. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, v. 66, p. 168-177, 2008.

KARTAL, F.; AKKAYA, A.; KILINC, A. Immobilization of porcine pancreatic lipase on glycidyl methacrylate grafted poly vinyl alcohol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 57, p. 55-61, 2009.

KIM, M. I.; HAM, H. O.; O., S. -D.; PARK, H. G.; CHANG, H. N.; CHOI, S. -H. Immobilization of *Mucor javanicus* lipase on effectively functionalized silica nanoparticles. *Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic*, v. 39, p. 62-68, 2006.

KITAMURA, S.; BAGATIN, E.; CAPITANI, E. M. de. Toxicologia da sílica. *Jornal de Pneumologia*, v. 22, p. 185-194, 1996.

KLEIN, E., YEAGER, D., SESHADRI, R., BAURMEISTER, U. Affinity adsorption devices prepared from microporous poly(amide) hollow fibers and sheet membranes. *Journal of Membrane Science*, v.129, p.31-46, 1997.

KNEZEVIC, Z.; MILOSAVIC, N.; BEZBRADICA, D.; JAKOVLJEVIC, Z.; PRODANOVIC, R. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit C supports by covalent attachment. *Biochemical Engineering Journal*, v. 30, p. 269-278, 2006.

KOBORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 29, n. 5, p. 1008-1014, set./out., 2005.

KUMAR, S.; KIKON, K.; UPADHYAY, A.; KANWAR, S. S.; GUPTA, R. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification*, v. 41, p. 38-44, 2005.

KUMAR, R.; MAHAJAN, S.; KUMAR, A.; SINGH, D. Identification of variables and value optimization for optimum lipase production by *Bacillus pumilus* RK31 using statistical methodology. *New Biotechnology*, v. 28, p. 65-71, 2010.

KUROIWA, T.; SHODA, H.; ICHIKAWA, S.; SATO, S.; MUKATAKA, S. Immobilization and stabilization of pullulanase from *Klebsiella pneumoniae* by a multipoint attachment method using activated agar gel supports. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2637-2642, 2005.

KUWABARA, K.; WATANABE, Y.; SHUJI A.; NAKANISHI, K.; MATSUNO, R. Synthesis of 6-*O*-unsaturated acyl l-ascorbates by immobilized lipase in acetone in the presence of molecular sieve. *Biochemical Engineering Journal*, v.16, p.17–22, 2003.

LAKSHMI, G. S.; RAO, C. S.; RAO, R. S.; ROBS, P. J.; PRAKASHAM, R. S. Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation using palm industrial waste: a statistical optimization. *Biochemical Engineering Journal*, v.48, p. 51-57, 2009.

LEE, S. –L.; CHEN, W. –C. Optimization of medium composition for the production of glucosyltransferase by *Aspergillus niger* with response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 21, p. 436-440, 1997.

LI, T; LI, S.; WANG, N.; TAIN, L. Immobilization and stabilization of pectinase by multipoint attachment onto an activated agar gel support. *Food Chemistry*, v. 109, p. 703-708, 2008.

LIMA, E. D. P. de A.; LIMA, C. A. de A. Complementação protéica da farinha de mandioca com a farinha de semente de abóbora. *Agropecuária Técnica*, v. 8, 1987.

LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos; fundamento e aplicações em química analítica. *Quím. Nova*, v. 2, n° 22, 1999.

LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL. Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos. Editora Edgard Blucher Ltda, v. 3, 2005.

LOFTY, W. A.; GHANEM, K. M.; EL-HELOW, E. R. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 3470-3477, 2007.

LOPES, M. de F. S.; LEITÃO, A. L.; REGALLA, M.; MARQUES, J. J. F.; CARRONDO, M. J. T.; CRESPO, M. T. B. Characterization of a highly thermostable extracellular lipase from *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 76, p. 107-115, 2002.

LOUSADA JUNIOR, COSTA, J. M. C.; NEIVA, J. N. M.; RODRIGUEZ, N. M. Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal. *Revista Ciência Agronômica*, v. 37, n° 1, p. 70-76, 2006.

LOZANO, P.; PÉREZ-MARTÍN, A.B.; DIEGOA, T. D.; GÓMEZ, B. D.; PAOLUCCI-JEANJEAN, D.; BELLEVILLE, M. P.; RIOS G.M; IBORRA, J.L. Active membranes coated with immobilized *Candida Antarctica* lipase B: preparation and application for continuous butyl butyrate synthesis in organic media. *Journal of Membrane Science*, v. 201, p.55–64, 2002.

LU, P.; HSIEH, Y.L. Lipase bound cellulose nanofibrous membrane via Cibacron Blue F3GA affinity ligand. *Journal of Membrane Science*, v. 330, p.288–296, 2009.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M.; RODRIGUES, M. I. Optimising the synthesis of isoamyl butyrate using *Rhizopus* sp. lipase with a central composite rotatable design. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 687-692, 2004.

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

MARTINS, E. da S.; SILVA, D.; SILVA, R. da; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry*, v. 37, n. 9, p. 949-954, 2002.

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

MAYORDOMO, I.; RANDEZ-GIL, F.; PRIETO, J. A. Isolation, purification and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Agricultura and Food Chemistry*, v. 48, p. 105-109, 2000.

MENEZES, G. D. G. de; OLIVEIRA, A. C. P. de; DAMASO, M. C. T.; OLIVEIRA, M. A. C. L. de; COURI, S. Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 em fermentação semi-sólida utilizando como substrato resíduo de maracujá e farelo de trigo. *Ver. Univ. Rural*, v. 25, n° 1, p. 15-27, 2006.

MENONCIN, S.; DOMINGUES, N. M.; FREIRE, D. M. G.; OLIVEIRA, J. V.; DI LUCCIO M.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. de. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v.29, n° 2, Campinas Apr./June 2009.

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

MOHAMED, S. A.; ABDEL-MAGEED, H. M.; TAYEL, S. A.; EL-NABRAWI, M. A.; FAHMY, A. S. Characterization of *Mucor racemosus* with potential application for the treatment of cellulite. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 642-648, 2010.

MONIER, M.; WEI, Y.; SARHAN, A. A. Evaluation of the potential of polymeric carriers based on photo-crosslinkable chitosan in the formulation of lipase from *Candida rugosa* immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 63, p. 93-101, 2010.

MORENO, J. M.; ARROYO, M.; HERNÁIZ, M. J.; SINISTERRA, J. V. Covalent immobilization of pure isoenzymes from lipase of *Candida rugosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 21, p. 552-558, 1997.

NAMBOORDIRI, V. M. H.; CHATTOPADHYAYA, R. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. *Lipids*, v. 35, n° 5, p. 495-502, 2000.

NETO, J. M. de M.; CIRNE, L. E. da M. R.; PEDROZA, J. P.; SILVA, M. G. da. Componentes Químicos da farinha de banana (*Musa sp.*) obtida por meio de secagem natural. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.2, n.3, p.316-318, 1998.

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

NOVAKI, L.; HASAN, S. D. M.; KADOWAKI, M. K.; ANDRADE, D. Produção de invertase por fermentação em estado sólido a partir de farelo de soja. *ENGEVISA*, v. 12, n° 2, p. 131-140, 2010.

OLIVEIRA, P. C. de; ALVES, G. M.; CASTRO, H. F. de. Immobilization studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene-divinylbenzene copolymer. *Biochemical Engineering Journal*, v. 5, p. 63-71, 2000.

OHNISHI, K.; YOSHIDA, Y.; TOITA, J.; SEKIGUCHI, J. Purification and characterization of a novel lipolytic enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 78, n° 6, p. 413-419, 1994.

ORDÓÑEZ, J. A.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. de F.; PERALES, L. de la H.; CORTECERO, M. D. S. Tecnologia de alimentos: Componentes dos Alimentos e Processos. V. 1. Porto Alegre-RS: ARTMED, 2005.

OZTURK, T. K.; KILINC, A. Immobilization of lipase in organic solvent in the presence of fatty acid additives. *Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 67, p. 214-218, 2010.

OZYILMAZ, G. The effect of spacer arm on hydrolytic and synthetic activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on silica gel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 56, p. 231-236, 2009.

PADILHA, G. S.; CASTIGLIONI, G. L.; ALEGRE, R. M.; TAMBOURGI, E. B. Avaliação de diferentes íons na atividade da lipase de *Pseudomonas cepacia*. *Exacta*, v. 7, n° 2, p. 181-186, 2009.

PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C.; WOSIACKI, G. Aproveitamento de bagaço de maçã para a produção de álcool e obtenção de fibras alimentares. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 29, n° 6, p. 1231-1238., 2005.

PAHUVANI, S.; KANWAR, S. S.; CHAUHAN, G.; GUPTA, R. Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: enzyme characteristics and stability. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 2566-2570, 2008.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I- bioprocess and products. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1153-1169, 2000. (a)

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

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. *Quím. Nova*, vol.29, n° 1, São Paulo, Jan./Feb. 2006.

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

PAULA, A. V.; BARBOZA, J. C. de S.; CASTRO, H. F. de. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. *Quím. Nova*, v. 28, n° 5, São Paulo, 2005.

PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; CASTRO, H. F. de; BRUNO, L. M. Comparação do desempenho da lipase de *candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. *Quím. Nova*, v. 31, n° 1, São Paulo, 2008.

PAZARLIOGLU, N. K.; TELEFONCU, A. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized on activated pumice partiel . *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1807-1814, 2005.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. de O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *J. Technol. Manag. Innov.*, v. 2, p. 118-127, 2007.

PINHEIRO, A. D. T.; BRÍGIDA, A. I. S.; GONÇALVES, L. R. B. Influência do pH no processo de imobilização de lipase em fibra da casca de coco verde. *VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científic*. Unicamp, SP, 2005.

PINHEIRO, R. C.; SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F. de; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Response surface methodology as na approach to determine optimal activities of lipase entrapped in sol-gel matrix using different vegetable oils. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 146, p. 203-214, 2008.

POLAINA, J.; MACCABE, A. P. Industrial enzymes: structure, function and applications. Editora Springer, 2007.

PRADO, A. G. S.; FARIA, E. A. Aplicação e Modificação química da sílica gel obtida de areia. *Quím. Nova*, v. 28, n° 3, p. 544-547, 2005.

PUJARI N.S.; VAIDYA, B.K.; BAGALKOTE, S.; PONRATHNAM, S.; NENEB, S. Poly(urethane methacrylate-*co*-glycidylmethacrylate)-supported-polypropylene biphasic membrane for lipase immobilization. *Journal of Membrane Science*, v. 285, p.395–403, 2006.

PUMAR, M.; FREITAS, M. C. J.; CERQUEIRA, P. M. de; SANTANGELO, S. B. Avaliação do efeito fisiológico da farinha de semente de abóbora (*Cucurbita maxima*, L.) no trato intestinal de ratos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 28 (Supl.): 7-13, dez., 2008.

QUANHONG, L.; CAILI, F. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds proteins. *Food Chemistry*, v. 92, p. 701-706, 2005.

QIAN, B.; LI, J.; WEI, Q.; BAI, P.; FANG, B.; ZHAO, C. Preparation and characterization of pH-sensitive polyethersulfone hollow fiber membrane for flux control. *Journal of Membrane Science*, v. 344, p. 297-303, 2009.

RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Statistical experimental design for evaluation of medium components for lipase production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233. *Food science and Technology*, v. 42, p. 985-992, 2009.

RITCHIE, R. J.; PRVAN, T. Current statistical methods for estimating the K_m and $V_{m\acute{a}x}$ of Michaelis-Menten kinetics. *Biochemical Education*, v. 24, 1996.

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.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. Editora Casa do pão, 1º ed., 2005.

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.

RODRÍGUEZ-DÍAZ, J. M.; SANTOS-MARTÍN, M. T. Study of the best designs for modifications of the Arrhenius equation. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 95, p. 199-208, 2009.

ROMDHANE, I. B. –B.; ROMDHANE, Z. B.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010.

ROSEVEAR, A.; KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S., Immobilized Enzymes and Cells. Adam Hilger, Bristol and Philadelphia, cap. 5, 1987.

ROUSSOS, S.; OLMOS, A.; RAIMBAULT, M.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; LONSANE, B. K. Strategies for large scale inoculum development for solid state fermentation system: conidiospores of *Trichoderma harzianum*. *Biotechnol. Tec.* 5, p. 415-420, 1991.

RÓS, P. C. M. da; SILVA, G. A. M.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. de. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 5508-5516, 2010.

SALIS, A.; MELONI, D.; LIGAS, S.; CASULA, M. F.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V.; DUMITRIU, E. Physical and Chemical adsorption of *Mucor javanicus* lipase on SBA-15 mesoporous silica. Synthesis, structural characterization and activity performance. *Langmuir*, v. 21, p. 5511-5516, 2005.

SANTANA, M. de F. S. de; SILVA, I. C. Elaboração de Biscoitos com Resíduo da Extração de Suco de Caju. Comunicado Técnico, Embrapa, Belém, PA, 2008.

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

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia industrial. Editora Edgard Blucher LTDA, v. 2, 2007.

SCHWAAB, M.; PINTO, J. C. Optimum reference temperature for reparameterization of the Arrhenius equation. Part 1: problems involving one kinetic constant. *Chemical Engineering Science*. V. 62, p. 2750-2764, 2007.

SEBRÃO, D.; SILVA, V. D.; NASCIMENTO, M. da G.; MOREIRA, M. A. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/ glicerol: aplicação na síntese de ésteres. *Quím. Nova*, v. 30, n ° 5, p. 1182-1187, 2007.

SEDAGHAT, M. E.; GHIACI, M.; AGHAEI, H.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Enzyme immobilization. Part 3: immobilization of α -amylase on α -bentonite and modified bentonite. *Applied Clay Science*, v. 46, p. 125-130, 2009.

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

SHARMA, S.; MALIK, A.; SATYA, S. Application of response surface methodology for optimization of nutrient supplementation for Cr (VI) removal by *Aspergillus lentulus* AML05. *Journal of Hazardous Materials*, v. 164, p. 1198-1204, 2009.

SHELDON, M. S.; SMALL, H. J. Immobilization and biofilm development of on *Phanerochaete chrysosporium* polysulphone and ceramic membranes. *Journal of Membrane Science*, v.263 , p. 30-37, 2005.

SHI, Y.; XU, X.; ZHU, Y. Optimization of *Verticillium lecanii* spore production in solid-state fermentation on sugarcane bagasse. *Appl. Microbial. Biotechnol.*, v. 82, p. 921-927, 2009.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. da S.; SILVA, R. da; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 8, p. 2885-2889, 2005.

SIMÕES, A. S.; MORI, R. Y.; FARIA, R.; CASTRO, H. F. de. Desempenho da matriz híbrida de SiO₂-quitosana na imobilização de lipase microbiana de *Candida rugosa*. *Química Nova*, 2010.

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

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

SOARES, C. M. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. *Quím. Nova*, v. 26, nº6, 2003.

SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A.; CASTRO, H. F. de; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 39, p. 69-76, 2006.

SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A.; CASTRO, H. F. de; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Studies on immobilized lipase in hydrophobic sol-gel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 113, p. 307-319, 2004. (b)

SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A.; OLIVO, J. E.; CASTRO, H. F. de; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Influence of the alkyl-substituted silane precursor on sol-gel encapsulated lipase activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 29, p. 69-79, 2004. (a)

SONG, Q.-X.; WEI, D.-Z. Study of Vitamin C ester synthesis by immobilized lipase from *Candida* sp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 18, p. 261-266, 2002.

SONG, Q.-X.; WEI, D.-Z.; ZHOU, W.-Y.; XU, W.-Q.; YANG, S.-L. Enzymatic synthesis and antioxidant properties of L-ascorbyl oleate and L-ascorbyl linoleate. *Biotechnology letters*, v. 26, p. 1777-1780, 2004.

TAN, T.; WANG, F.; ZHANG, H. Preparation of PVA/ chitosan lipase membrane reactor and its application in synthesis of monoglyceride. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.18, p.325–331, 2002.

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

TOCA-HERRERA, J. L.; OSMA, J. F.; COUTO, S. R. Potential of solid-state fermentation for laccase production. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, p. 391-400, 2007.

TORIBIO, F.; MARTÍNEZ-LARA, E.; PASCUAL, P.; LÓPEZ-BAREA, J. Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes. *Journal of Chromatography B*, v. 684, p. 77-97, 1996.

TZAFRIRI, A. R.; EDELMAN, E. R. Quasi-steady-state kinetics at enzyme and substrate concentration in excess of the Michaelis-Menten constant. *Journal of Theoretical Biology*, v. 245, p. 737-748, 2007.

UL-HAQ, I.; IDRESS, S.; RAJOKA, M. I. Productions of lipase by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 637-641, 2002.

VAILLANT, F.; MILLAN, A.; MILLAN, P.; DORNIER, M.; DECLoux, M.; REYNES, M. Co-immobilized pectinlyase and endocellulase on chitin and nylon supports. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 989-996, 2000.

VISHWANATH, S.; BHATTACHARYYA, D.; HUANG, W.; BACHAS, L. G. Site-directed and random enzyme immobilization on functionalized membranes: kinetic studies and models. *Journal of Membrane Science*, v. 108, p. 1-13, 1995.

VENDRUSCOLO, F.; RIBEIRO, C. da S.; ESPOSITO, E.; NINOW, J. L. Protein enrichment of apple pomace and use in feed for Nile tilapia. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 152, n° 1, p. 74-87, 2009.

VIEIRA, Y. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Curcubita pepo*). *Quím. Nova*, v. 26, n°1, 2003.

VULFSON, E. N.; WOOLEY, P.; PETERSEN, S. B. Lipase: their structure, biochemistry and application. Cambridge University Press: Great Britain, 1994.

WANG, Y.; HSIEH, Y.-L. Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes. *Journal of Membrane Science*, v. 309, p. 73–81, 2008.

WANG, X.; YU, X.; XU, Y. Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. *Enzyme and microbial Technology*, v. 45, p. 94-102, 2009.

WEISSENBORN, M., HUTTER, B., SINGH, M., BEESKOW, T.C., ANSPACH, F.B. A study of combined filtration and adsorption on nylon-based dye-affinity membranes: Separation of recombinant L-alanine dehydrogenase from crude fermentation broth. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.25, p.159-168, 1997.

WISEMAN, A. Principios de Biotecnologia. Editora Acribia, 1986.

WOLSKI, E.; MENUSI, E.; REMONATTO, D.; VARDANEGA, R.; ARBTER, F.; RIGO, E.; NINOW, J.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D. de; TREICHEL, H. Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid state and submerged fermentation: a comparative study. *Food Science and Technology*, v. 42, p. 1557-1560, 2009.

XANTHOPOULOU, M. N.; NOMIKOS, T.; FRAGOPOULOU, E.; ANTONOPOULOU, S. Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activities of pumpkin seeds extract. *Food Research International*, v. 42, p. 641-646, 2009.

XU, Z. -L.; QUSAY, F. A. Polyethersulfone (PES) hollow fiber ultrafiltration membranes prepared by PES/ non-solvent/ NMP solution. *Journal of Membrane Science*, v. 233, p. 101-111, 2004.

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.

YANG, G.; WU, J.; XU, G.; YANG, L. Enhancement of the activity and enantioselectivity of lipase in organic systems by immobilization onto low-cost support. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 57, p. 96–103, 2009.

YANG, Z.; SI, S.; DAI, H.; ZHANG, C. Piezoelectric urea biosensor based on immobilization of urease onto nanoporous alumina membranes. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, p. 3283-3287, 2007.

YE, P.; XU, Z.-K.; CHE, A.-F.; WU, J.; SETA, P. Chitosan-tethered poly(acrylonitrile-co-maleic acid) hollow fiber membrane for lipase immobilization. *Biomaterials*, v. 26, p. 6394-6403, 2005.

YESILOGLU, Y. Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2155-2159, 2005.

YI, M.; LIU, Q. Michaelis-Menten mechanism for single-enzymes and multi-enzymes system under stochastic noise and spatial diffusion. *Physica A: statistical mechanics and its applications*, v. 389, p. 3791-3803, 2010.

YIGITOGU, M.; TEMOÇIN, Z. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glutaraldehyde-activated polyester fiber and its application for hydrolysis of some vegetable oils. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 66, p. 130-135, 2010.

YILMAZ, E.; CAN, K.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester. *Bioresource Technology*, 2010.

YUJUN, W.; XU JIAN, X.; GUANGSHENG, L.; YOUYUAN, D. Immobilization of lipase by ultrafiltration and cross-linking onto the polysulfone membrane surface. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 2299–2303, 2008.

ZANIN, G.M., MORAES, F. F. “Enzimas imobilizadas”. In: SURAIA, S. e PIETRO, R.C.L. (eds). *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto, Legis Summa, cap.4,.413, 2004.

ZENG, X., RUCKENSTEIN, E. Control of pore sizes in macroporous chitosan and chitin membranes. *Industrial Engineering Chemical Research*, v.35, p.4169-4175, 1996.

ANEXO I

Procedimentos para o preparo de algumas soluções

1. Solução de acetil acetona em Na₂CO₃ 0,5 N

Misturar 1 mL de acetil acetona em 50 mL de solução de Na₂CO₃ 0,5 N.

Obs: esta solução não pode ser estocada, devendo ser preparada na hora do ensaio.

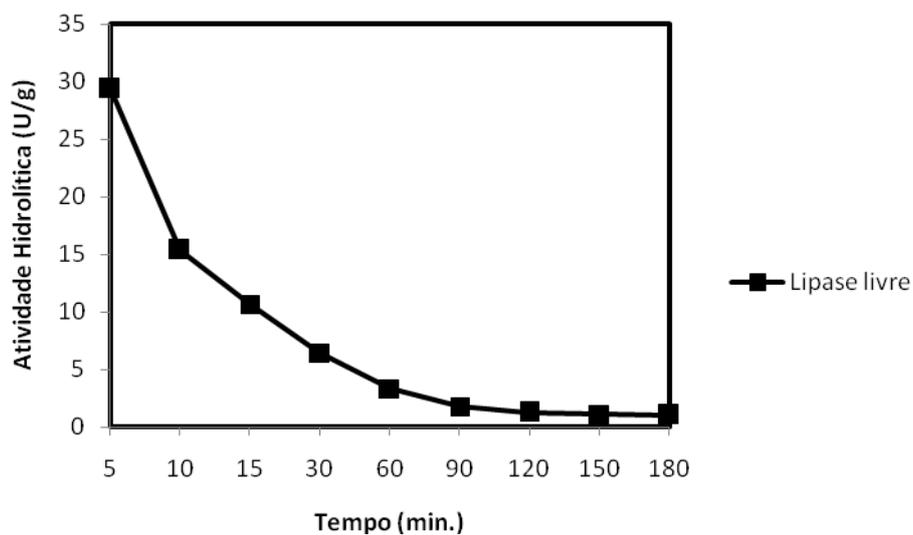
2. Reagente de Erlich

Dissolver 2,67 g de DAB (p-dimetilaminobenzaldeído) em um volume pequeno (em torno de 30 mL) de etanol/ ácido clorídrico 1:1. Após a dissolução, completar o volume pra 100 mL com água destilada.

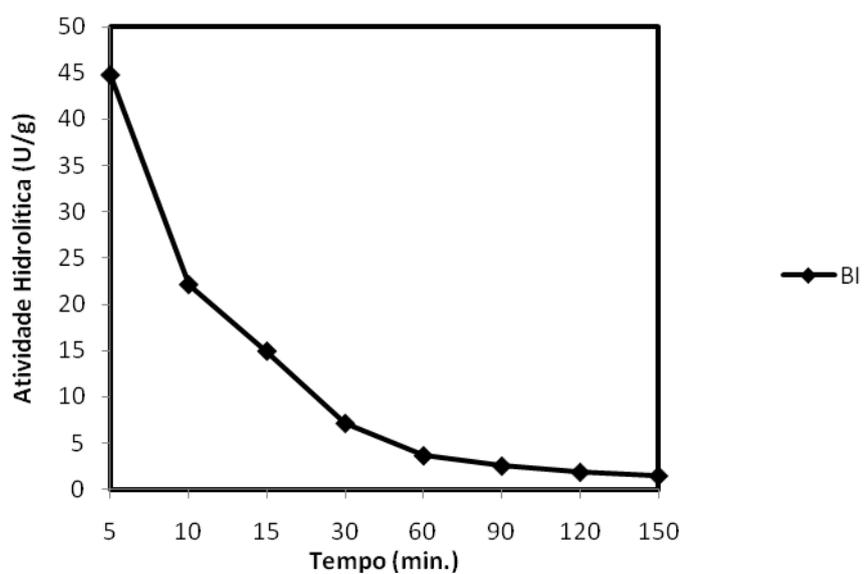
ANEXO II

Determinação do tempo de reação das lipases nas formas livre e imobilizada

1. Lipase parcialmente purificada



2. Biocatalisador Imobilizado (BI)



ANEXO III

Curva padrão utilizada como base em alguns experimentos

1. Curva Padrão de Bradford para Determinação da Concentração de Proteína

