



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Candida rugosa* E *Geotrichum candidum* EMPREGANDO MELAÇO DE SOJA**

**WILSON GALVÃO DE MORAIS JÚNIOR**

Uberlândia - MG  
2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* EMPREGANDO MELAÇO DE SOJA**

Wilson Galvão de Morais Júnior

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Miriam Maria de Resende

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

Uberlândia - MG  
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG - Brasil

---

M827p Morais Júnior, Wilson Galvão de, 1984-  
2013 Proudução de lipase por *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*  
empregando melaço de soja / Wilson Galvão de Morais Júnior. - 2013.

112 f. : il.

Orientadora: Miriam Maria de Resende.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Pro-  
grama de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui bibliografia.

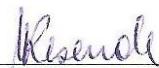
1. Engenharia Química - Teses.
  2. Lipase - Teses.
  3. Melaço - Teses.
  4. Soja - Teses.
- I. Resende, Miriam Maria de. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

---

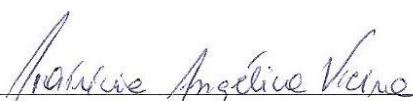
CDU: 66.0

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 11 DE JANEIRO DE 2013.

BANCA EXAMINADORA:

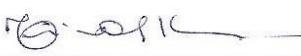
  
Profª. Drª. Miriam Maria de Resende  
Orientadora (PPGEQ/UFU)

  
Profª. Drª. Vicelma Luiz Cardoso  
Co-Orientadora (PPGEQ/UFU)

  
Profª. Drª. Patrícia Angélica Vieira  
(PPGEQ/UFU)



Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro  
(PPGEQ/UFU)

  
Profª. Drª. Eliana Setsuko Kamimura  
(FZEA/USP)

## **Agradecimentos**

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível:

À professora doutora Miriam Maria de Resende, orientadora desta dissertação, pela confiança em meu trabalho, por todo o conhecimento transferido, pela sabedoria e amizade.

À professora doutora Vicelma Luiz Cardoso, pela co-orientação, disponibilidade irrestrita, empenho, paciência, estímulo e dedicação.

Aos demais professores e funcionários da FEQUI/UFU, pela contribuição no meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições.

Aos meus pais, meus heróis, sou-lhes grato por todo apoio, carinho e esforço dedicados para o meu engrandecimento como pessoa.

Ao meu irmão, minha cunhada e familiares, que muito me apoiaram e incentivaram nesta caminhada.

A todos os amigos que conquistei nesse caminho, que já deixam saudades, mas que serão levados comigo por onde for. Pela paciência e grande amizade com que sempre me ouviram e sensatez com que sempre me ajudaram. Pela diversão, aprendizado e convivência, que muito me estimularam nessa jornada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo apoio financeiro durante os anos do curso.

Também sou grato a todos aqueles que, direta ou indiretamente, me deram oportunidades, confiaram em mim, me incentivaram a lutar pelos meus ideais e me acompanharam.

Agradeço, por fim, a Deus, que me concedeu o privilégio de nascer e viver entre estas pessoas sensacionais que são o alicerce desta conquista.

*A consciência de um indivíduo não deve  
subordinar-se à lei da maioria.*

(Harper Lee)

# Sumário

Listas de Figuras.....	i
Listas de Tabelas .....	iv
Resumo.....	v
Abstract .....	vi
CAPÍTULO 1 .....	1
INTRODUÇÃO .....	1
CAPÍTULO 2 .....	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
2.1. Lipases .....	5
2.1.1. Lipases de origem microbiana .....	7
2.1.1.1. Lipases de <i>Candida rugosa</i> .....	9
2.1.1.2. Lipases de <i>Geotrichum candidum</i> .....	9
2.1.2. Aplicações das Lipases .....	10
2.1.3. Reações Catalisadas por Lipases .....	13
2.2. Processos Fermentativos.....	13
2.2.1. Fermentação em Estado Semi-Sólido (FES) .....	14
2.2.2. Fermentação Submersa (FS).....	15
2.3. Influência do Meio na Produção de Lipase .....	17
2.3.1. pH.....	18
2.3.2. Temperatura.....	18
2.3.3. Fonte de Carbono.....	19
2.3.4. Fonte de Nitrogênio .....	20
2.3.5. Agitação .....	21
2.4. O Melaço de Soja .....	22
2.5. Purificação Enzimática .....	25
2.5.1. Sistema Aquoso Bifásico (SAB) .....	27
2.5.2. Aplicações do Sistema Aquoso Bifásico.....	30
CAPÍTULO 3 .....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Micro-organismos .....	32
3.2. Meio Fermentativo (Melaço de Soja).....	32
3.3. Testes Preliminares para a Produção de Lipase .....	32
3.4. Metodologia Experimental para a Produção de Lipase .....	33
3.5. Planejamento Experimental para a Produção de Lipase.....	35
3.6. Metodologia Analítica .....	37
3.6.1. Atividade de Lipase .....	37
3.6.2. Atividade de Protease.....	38
3.6.3. Crescimento Celular.....	38
3.6.4. Concentração de Proteína.....	38
3.7. Testes Preliminares para o Sistema Aquoso Bifásico .....	39
3.8. Metodologia Experimental para a Purificação da Lipase (Sistema Aquoso Bifásico) .	39
3.9. Planejamento Experimental para a Purificação da Lipase (Sistema Aquoso Bifásico)	39
3.10. Cálculos das Respostas do Sistema Aquoso Bifásico .....	41
3.10.1. Seletividade .....	41
3.10.2. Fator de Purificação .....	42
3.10.3. Rendimento da Enzima Purificada.....	42

CAPÍTULO 4 .....	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1. Testes Preliminares para a Produção de Lipase .....	44
4.2. Planejamento Experimental para a Produção de Lipase.....	488
4.2.1. Atividade de Lipase do Caldo Enzimático Fermentado por <i>Candida rugosa</i> ....	50
4.2.2. Atividade de Lipase do Caldo Enzimático Fermentado por <i>Geotrichum candidum</i> .....	55
4.2.3. Reprodutibilidade do Ponto Otimizado para a Produção de Lipase .....	500
4.3. Testes Preliminares para a Purificação da Lipase (Sistema Aquoso Bifásico).....	61
4.3.1. Influência das Composições das Fases na Atividade de Lipase .....	61
4.3.2. Diagrama de Fases .....	503
4.3.3. Seleção do Sistema Aquoso Bifásico.....	64
4.4. Planejamento Experimental para a Purificação da Lipase (Sistema Aquoso Bifásico) 65	65
4.4.1. Seletividade .....	66
4.4.2. Fator de Purificação .....	73
4.4.3. Rendimento da Enzima Purificada .....	80
4.4.4. Reprodutibilidade do Ponto Otimizado para a Purificação .....	81
CAPÍTULO 5 .....	82
CONCLUSÕES .....	82
CAPÍTULO 6 .....	83
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
APÊNDICE A.....	97
DOSAGEM DE PROTEÍNA .....	97

## Lista de Figuras

2.1 – Reações catalisadas por lipases (BON & FERRARA, 2008) .....	7
2.2 – Fluxograma do balanço de massa do processamento da soja (adaptado de SIQUEIRA, 2007) .....	22
2.3 – Fluxograma da produção de farelo concentrado de soja (72% de proteína) (adaptado de SILVA, 2011) .....	23
2.4 – Esquema representativo de um diagrama de equilíbrio (SILVA & LOH, 2006) .....	29
3.1 – Reatores de bancada prontos para o processo de produção de lipase .....	34
3.2 – Incubadora rotativa, utilizada nos experimentos .....	34
4.1 – Resultados de atividade de lipase, atividade de protease e de crescimento celular obtidos nos testes preliminares cinéticos com melaço de soja fermentado por <i>Candida rugosa</i> .....	45
4.2 – Resultados de atividade de lipase, atividade de protease e de crescimento celular obtidos nos testes preliminares cinéticos com melaço de soja fermentado por <i>Geotrichum candidum</i> .....	45
4.3 – Resultados de atividade de lipase, atividade de protease e de crescimento celular obtidos nos testes preliminares variando a concentração de melaço de soja no meio fermentado por <i>Candida rugosa</i> .....	46
4.4 – Resultados de atividade de lipase, atividade de protease e de crescimento celular obtidos nos testes preliminares variando a concentração de melaço de soja no meio fermentado por <i>Geotrichum candidum</i> .....	46
4.5 – Resultados de atividade de lipase, atividade de protease e de crescimento celular obtidos nos testes preliminares variando o pH do meio contendo melaço de soja no meio fermentado por <i>Candida rugosa</i> .....	47
4.6 – Resultados de atividade de lipase, atividade de protease e de crescimento celular obtidos nos testes preliminares variando o pH do meio contendo melaço de soja no meio fermentado por <i>Geotrichum candidum</i> .....	48
4.7 – Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para atividade de lipase de <i>Candida rugosa</i> .....	52
4.8 – Distribuição dos resíduos para a resposta atividade de lipase de <i>Candida rugosa</i> .....	52

4.9 – Superfície de resposta e curva de contorno para a atividade de lipase de <i>Candida rugosa</i> em função do pH e da temperatura de fermentação .....	53
4.10 – Superfície de resposta e curva de contorno para a atividade de lipase de <i>Candida rugosa</i> em função do pH e da concentração de melaço de soja no meio .....	53
4.11 – Superfície de resposta e curva de contorno para a atividade de lipase de <i>Candida rugosa</i> em função da temperatura de fermentação e da concentração de melaço de soja no meio .....	54
4.12 – Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para atividade de lipase de <i>Geotrichum candidum</i> .....	57
4.13 – Distribuição dos resíduos para a resposta atividade de lipase de <i>Geotrichum candidum</i> .....	57
4.14 – Superfície de resposta e curva de contorno para a atividade de lipase de <i>Geotrichum candidum</i> em função do pH e da temperatura de fermentação .....	58
4.15 – Superfície de resposta e curva de contorno para a atividade de lipase de <i>Geotrichum candidum</i> em função do pH e da concentração de melaço de soja no meio .....	58
4.16 – Superfície de resposta e curva de contorno para a atividade de lipase de <i>Geotrichum candidum</i> em função da temperatura de fermentação e da concentração de melaço de soja no meio .....	59
4.17 – Diagrama de fase dos sistemas aquosos bifásicos (SABs). As curvas binodais do etanol (■) e do 2-propanol (●) foram plotadas contra (a) fosfato de potássio, (b) sulfato de amônio e (c) citrato de sódio .....	63
4.18 – Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para seletividade de <i>Candida rugosa</i> .....	68
4.19 – Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para seletividade de <i>Geotrichum candidum</i> .....	69
4.20 – Distribuição dos resíduos para a resposta seletividade de <i>Candida rugosa</i> .....	70
4.21 – Distribuição dos resíduos para a resposta seletividade de <i>Geotrichum candidum</i> .....	70
4.22 – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta seletividade de <i>Candida rugosa</i> em função da concentração de 2-propanol e da concentração de fosfato de potássio .	71
4.23 – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta seletividade de <i>Geotrichum candidum</i> em função da concentração de 2-propanol e da concentração de fosfato de potássio .....	71
4.24 – Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para a resposta fator de purificação da lipase de <i>Candida rugosa</i> .....	75

4.25 – Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para a resposta fator de purificação da lipase de <i>Geotrichum candidum</i> .....	75
4.26 – Distribuição dos resíduos para a resposta fator de purificação da lipase de <i>Candida rugosa</i> .....	76
4.27 – Distribuição dos resíduos para a resposta fator de purificação da lipase de <i>Geotrichum candidum</i> .....	77
4.28 – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta fator de purificação da lipase de <i>Candida rugosa</i> em função da concentração de 2-propanol e da concentração de fosfato de potássio .....	77
4.29 – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta fator de purificação da lipase de <i>Geotrichum candidum</i> em função da concentração de 2-propanol e da concentração de fosfato de potássio .....	78

## **Lista de Tabelas**

2.1 – Aplicações industriais de lipases (Fonte: MALDONADO, 2006) .....	12
2.2 – Composição média do melaco de soja (Fonte: SIQUEIRA, 2007) .....	24
2.3 – Exemplos de componentes e tipos de Sistema Aquoso Bifásico (Fonte: PESSOA JÚNIOR & KILIKIAN, 2005) .....	28
3.1 – Valores utilizados no planejamento experimental para três variáveis independentes ....	36
3.2 – Matriz do Planejamento Composto Central com valores codificados e originais das variáveis, para ambos os micro-organismos .....	37
3.3 – Valores utilizados no planejamento experimental para as duas variáveis independentes .....	41
3.4 – Matriz do Planejamento Composto Central com valores codificados e originais das variáveis, para ambos os micro-organismos .....	41
4.1 – Variáveis utilizadas no Planejamento Composto Central e a resposta de atividade de lipase para <i>Candida rugosa</i> e <i>Geotrichum candidum</i> .....	49
4.2 – Regressão múltipla para a resposta atividade de lipase de <i>Candida rugosa</i> .....	50
4.3 – Regressão múltipla para a resposta atividade de lipase de <i>Geotrichum candidum</i> .....	56
4.4 – Efeito das composições das fases na estabilidade da atividade de lipase para <i>Candida rugosa</i> e <i>Geotrichum candidum</i> . As concentrações de álcool e sal foram expressas em (% v/v) e (% p/v), respectivamente .....	62
4.5 – Partição da lipase de <i>Candida rugosa</i> e <i>Geotrichum candidum</i> em diferentes sistemas álcool/sal .....	64
4.6 – Variáveis utilizadas no PCC e as respostas de seletividade (S) e fator de purificação (FP) para <i>Candida rugosa</i> e <i>Geotrichum candidum</i> .....	66
4.7 – Regressão múltipla para a resposta seletividade de <i>Candida rugosa</i> .....	67
4.8 – Regressão múltipla para a resposta seletividade de <i>Geotrichum candidum</i> .....	67
4.9 – Regressão múltipla para a resposta fator de purificação de <i>Candida rugosa</i> .....	73
4.10 – Regressão múltipla para a resposta fator de purificação de <i>Geotrichum candidum</i> ....	73
4.11 – Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta fator de purificação de <i>Candida rugosa</i> .....	74
4.12 – Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta fator de purificação de <i>Geotrichum candidum</i> .....	74

## Resumo

Lipase (EC 3.1.1.3), é uma enzima que hidrolisa os ésteres de glicerol, é muitas vezes utilizadas em aplicações biotecnológicas e industrial. Lipase de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* são conhecidas por ter características tais como ampla especificidade em substratos, tolerância em relação aos solventes orgânicos e de elevada estabilidade térmica. Estas características permitem que a lipase seja utilizada como um biocatalisador em aplicações industriais que são realizadas a temperaturas elevadas ou na presença de solventes orgânicos. Desta forma, o presente trabalho estuda a produção de lipase por *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* num meio de cultura composto por melaço de soja. Após otimizar o tempo de fermentação para ambos micro-organismos, foram realizados testes variando a concentração de melaço de soja, o pH do meio fermentativo e a temperatura de fermentação. Quando utilizou-se melaço de soja numa concentração de 200 g/L à 25°C, a atividade lipolítica medida no caldo, foi 5.25 U/mL após 12 horas para *Candida rugosa* e 6.25 U/mL após 24 horas para *Geotrichum candidum*. Um Planejamento Composto Central (PCC) foi definido variando-se a concentração de melaço de soja, o pH inicial do meio e a temperatura de fermentação. Concluiu-se que o meio composto de 200 g/L de melaço de soja em pH de  $3,5 \pm 0,1$  e a temperatura de fermentação em  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , a atividade de lipase aumentou, em média, 12.02 U/mL para a *Candida rugosa*, o que representou um aumento de 129% em relação à atividade obtida nos testes preliminares, e 11,48 U/mL para o *Geotrichum candidum*, representando um aumento de 84% em relação à atividade obtida nos testes preliminares. Lipases microbianas são usualmente purificadas com Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs) compostos por polímero/polímero, polímero/sal ou álcool/sal. Os resultados obtidos com experimentos de purificação são bastante promissores, sugerindo que estes SABs poderiam ser adotados para aplicação em escala industrial. SABs têm alcançado uma purificação desejada de lipases, derivadas de fontes microbianas, sendo necessário também menos tempo do que os métodos convencionais que necessitam de várias etapas anteriores. Este trabalho, também descreve a purificação das lipases derivadas de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*, produzida em melaço de soja. O SAB utilizado para a recuperação destas lipases foi composto por álcool/sal-básico. Seis sistemas bifásicos, compostos por álcool (etanol e 2-propanol) na fase superior, e um sal-básico (fosfato de potássio dibásico, citrato de sódio e sulfato de amônio), foram avaliados quanto à sua eficácia na recuperação da lipase. A estabilidade da lipase em cada uma das soluções foi testada. A partir dos resultados obtidos em testes preliminares realizou-se um Planejamento Composto Central (PCC), a fim de otimizar a purificação das lipases por SAB. A eficiência máxima de partição para a purificação de lipase para ambos os micro-organismos foram obtidas no SAB contendo 20% (p/p) de 2-propanol e 20% (p/p) de fosfato de potássio. A lipase de *Candida rugosa* purificada apresentou uma seletividade média de 292,54, um fator de purificação médio de 12,13 e um rendimento médio de 95,57%, enquanto a lipase de *Geotrichum candidum* purificada apresentou uma seletividade média de 272,78, um fator de purificação médio de 11,40 e um rendimento médio de 95,70%.

**Palavras-chave:** lipase microbiana, *Candida rugosa*, *Geotrichum candidum*, melaço de soja, Sistema Aquoso Bifásico.

## Abstract

Lipase (EC 3.1.1.3), an enzyme that hydrolyses the esters in glycerol, is often used for biotechnological and industrial applications. *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* lipases are known to have characteristics such as broad substrate specificity, tolerance toward organic solvents and high thermal stability. These characteristics permit the lipase to be used as a biocatalyst in industrial applications that are performed at elevated temperatures or in the presence of organic solvents. In this way, the present work describes the production of lipase by *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in a culture supplemented with soybean molasses. After optimizing the fermentation times for both microorganisms, the effects of changing the soybean molasses concentration, the fermentative environment pH and the fermentation temperature were evaluated. When soybean molasses was used at a concentration of 200 g/L at 25 °C, the lipolytic activity measured in the broth was 5.25 U/mL after 12 hours for *Candida rugosa* and 6.25 U/mL after 24 hours for *Geotrichum candidum*. Central composite planning (CCP) was used to define the optimal combination of soybean molasses concentration, initial environmental pH and fermentation temperature. This analysis determined that, in a medium containing 200 g/L soybean molasses at pH  $3.5 \pm 0.1$  and a fermentation temperature of  $27 \pm 1$  °C, the lipase activity increased by an average of 2.12 U/mL for *Candida rugosa*, representing an increase of 129% compared with the activity obtained in preliminary tests, and 11.48 U/mL for *Geotrichum candidum*, representing an increase of 84% compared with the activity obtained in preliminary tests. Furthermore, microbial lipases are usually purified with polymer/polymer and polymer/salt ATPSs (Aqueous two-phase systems). The findings of these purification experiments were promising, suggesting that the polymer/polymer and polymer/salt ATPSs could potentially be adopted for industrial-scale operation. ATPSs have achieved desired purification of lipases derived from microbial sources in less time than conventional multi-step downstream. The present work describes the purification of lipase derived from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum*, produced in a culture supplemented with soybean molasses. Alcohol/salt-based aqueous two-phase systems (ATPSs) were used to recover these lipases. Six biphasic systems, comprised of an alcohol-based top phase (ethanol and 2-propanol) and a salt-based bottom phase (potassium phosphate, sodium citrate and ammonium sulfate), were evaluated for their effectiveness in lipase recovering. The stability of lipase in each of the solutions was tested. From the results obtained in preliminary tests was held Central Composite Planning (CCP) in order to optimize the purification of lipases by ATPS. The optimum partition efficiency for purification of lipase for both micro-organisms was obtained in an ATPS of 20% (w/w) 2-propanol and 20% (w/w) potassium phosphate. The *Candida rugosa* lipase purified had a mean selectivity of 292.54, mean purification factor of 12.13 and a mean yield of 95.57%, while for *Geotrichum candidum* lipase purified had a mean selectivity of 272.78, mean purification factor 11.40 and a mean yield of 95.70%.

**Key Words:** microbial lipase, *Candida rugosa*, *Geotrichum candidum*, soybean molasses, Aqueous two-phase systems.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

Triacilglicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3), nome sistemático das lipases, também conhecidas como hidrolases, são enzimas que realizam a catálise na hidrólise de triglycerídeos de cadeia longa (KUMAR et al., 2005; SALIHU et al., 2011). Elas atuam na interface orgânica aquosa catalisando a hidrólise das ligações éster-carboxílicas presentes em acilgliceróis liberando ácidos orgânicos e glicerol. Nestas condições, as lipases podem catalisar reações de esterificação, interesterificação ou transesterificação (GHALY et al., 2010; LIU et al., 2008).

As lipases, comumente encontradas na natureza, podem ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (YANG et al., 2005; RIGO et al., 2010), sendo que as de origem microbiana tem sido mais estudadas devido à versatilidade de suas propriedades, como a estabilidade a altas temperaturas, ampla faixa de atuação em relação ao pH, sua seletividade na resolução de misturas racêmicas e pela facilidade de produção em massa (HASAN et al., 2006; LI et al., 2001). No entanto, os elevados custos de produção destas enzimas, limitam sua utilização industrial (PAQUES & MACEDO, 2006).

Estudos envolvendo diferentes micro-organismos, suplementos e substratos na produção de lipase por fermentação submersa podem contribuir na busca de condições ideais para obtenção desta enzima com altos rendimentos, visando à redução de custos do processo de produção em escala industrial (VARGAS et al., 2007).

Para obter bons resultados na produção de lipase, é necessário que o meio da fermentação submersa contenha fontes de carbono como glicose, xilose, maltose, lactose, sacarose, glicose, glicerol, entre outras, fontes de nitrogênio e vitaminas necessárias para o metabolismo do micro-organismo (PINHEIRO et al., 2008).

Treichel et al. (2010) e Salihu et al. (2012) afirmam que o uso de resíduos e subprodutos agroindustriais como substratos para a produção de lipases ajuda na redução significativa dos custos de produção associados ao substrato.

O melaço de soja é um subproduto gerado pela evaporação do líquido remanescente da secagem da proteína concentrada de soja, com alta concentração de açúcares, nitrogênio, ácidos graxos, aminoácidos e minerais (SIQUEIRA, 2007; SILVA, 2011).

No processo de produção de concentrados proteicos, o melaço é concentrado até 50% de sólidos totais e posteriormente adicionado a rações animais. Silva (2011) estudou a

possibilidade de produzir etanol a partir de melaço de soja hidrolisado enzimaticamente e Romão (2011) estudou a produção de etanol pela hidrólise ácida do melaço de soja.

Da variedade de leveduras produtoras de lipase, a *Candida rugosa* é um produtor de lipase potente (TAN et al., 2003; TOMMASO et al., 2010) e o *Geotrichum candidum* produz uma lipase ácido-graxos específicas que são mais específicas pois reagem bem com ácidos graxos de ligações duplas (MLADENOSKA & DIMITROVSKI, 2001). Pelo significativo valor agregado das lipases, a produção dessas enzimas em melaço de soja é uma alternativa rentável por utilizar um subproduto agrícola como substrato.

O grau de pureza das lipases influencia na sua aplicação, porém a purificação é uma etapa essencial para o estudo das propriedades biológicas e moleculares desses biocatalisadores. A ausência de impurezas aumenta as aplicações desta enzima e um alto nível de atividade lipolítica, não sendo necessária a utilização de grandes quantidades da enzima para se obter o resultado desejado. Um dos maiores problemas referentes à purificação é a complexidade estrutural destas enzimas e a necessidade de manter as suas propriedades biológicas após a aplicação da técnica de purificação (BASSANI et al., 2010).

De forma geral, as enzimas podem ser purificadas por etapa única (por exemplo, cromatografia de afinidade) ou por uma combinação de várias etapas (por exemplo, precipitação, tecnologia de membranas, troca iônica, filtração em gel, etc.). A precipitação é descrita como uma tecnologia bastante simples, que pode ser utilizada para remover impurezas ou isolar uma proteína alvo numa mistura. Dentre as técnicas de precipitação, a utilização de sulfato de amônio é a mais utilizada por precipitar a maioria das proteínas em uma molaridade alta, não promover o aquecimento da solução (em comparação com a utilização de solventes como etanol), apresentar uma densidade que não interfere na sedimentação da maioria das proteínas e promover o efeito de concentração das proteínas (KANWAR et al., 2006).

Devido à baixa especificidade, a técnica de precipitação é considerada de baixa resolução de separação. Após um estudo sobre métodos de purificação, Saxena et al. (2003) observaram que cerca de 80% dos sistemas de purificação utilizam a etapa de precipitação, sendo que, 60% utilizam sulfato de amônio e 35% usam acetona, etanol ou um ácido, seguido pela combinação de algum método cromatográfico.

Apesar da cromatografia ser considerada um método de purificação bastante eficaz e muito utilizado à nível industrial, muitos pesquisadores continuam à procura de novas alternativas de purificação.

Em geral, a fase de purificação é a etapa que mais contribui para o custo total de obtenção de uma enzima, sendo esta etapa, essencial para a aplicação enzimática industrial. Por isso a escolha do processo de purificação deve ser feita levando em consideração a necessidade de otimizar a recuperação da atividade enzimática e do alto grau de pureza evitando sucessivas etapas, com aplicação de processo simples e barato.

Comparando as técnicas citadas anteriormente, a partição em sistema aquoso bifásico é uma alternativa bastante eficiente para a separação e purificação de bioproductos como proteínas. Tem-se como vantagens uma fácil aplicação em grande escala, ambiente biocompatível, baixa tensão interfacial, baixa energia, operação contínua e alta sensibilidade no reconhecimento das interações das proteínas ligantes (SELVAKUMAR et al., 2010).

Os SABs que estão atualmente sendo utilizados são baseados em um sistema de polímero/polímero, tal como polietileno glicol (PEG)/dextrana, ou um sistema de polímero/sal, tal como o PEG/fosfato de potássio. Os SABs polímero/polímero e polímero/sal têm várias desvantagens, incluindo o alto custo dos polímeros, a separação lenta das duas fases e as complicações associadas com a reciclagem dos componentes da fase (TIANWEI et al., 2002). As vantagens deste sistema incluem a sua baixa viscosidade, alta polaridade e da facilidade com que o álcool pode ser recuperado por evaporação. Além disso, o sistema é de baixo custo e de baixa toxicidade para o ambiente (TIANWEI et al., 2002). Em comparação com os sistemas de polímero/sal e polímero/polímero, o sistema álcool/sal com base não tem sido tão estudado para purificação. A desvantagem principal deste sistema é que muitas biomoléculas alvo (tais como proteínas ou enzimas) são incompatíveis com a fase do solvente orgânico, que pode inativar ou desnaturar as biomoléculas (OOI et al., 2009).

Baseado no exposto, o presente trabalho apresenta como objetivo geral avaliar a produção e a concentração da enzima lipase, empregando as cepas de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* e como substrato o melaço de soja (co-produto do processo de produção do concentrados protéicos de soja).

Como objetivos específicos pode-se citar:

- Estudar o tempo de fermentação e avaliar, em testes preliminares, as faixas de concentração de melaço de soja no meio para produção de lipase por *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* a serem utilizadas no planejamento composto central (PCC);
- Comparar o desempenho entre os dois micro-organismos e determinar as melhores condições a serem utilizadas para produção de lipase empregando a técnica de superfície de resposta;
- Avaliar a influência do pH e da temperatura na fermentação;

- Utilizar sistemas aquosos bifásicos para avaliar seu desempenho na purificação da lipase produzida em melaço de soja por *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*.

## CAPÍTULO 2

# REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Lipases*

As enzimas lipolíticas ou lipases pertencem ao grupo das serina hidrolases (triacilglicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) pois seus substratos naturais são triglycerídeos e o seu modo de ação é semelhante aos das estereases. São biocatalisadores que atuam na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise das ligações éster-carboxílicas e liberando ácidos e alcoóis orgânicos e apresentam maior afinidade por ácidos graxos de cadeia longa (BON et al., 2008). Porém, ao contrário de muitas outras enzimas, as lipases apresentam níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos, facilitando a catálise de muitas reações, tais como esterificação, transesterificação, acidólise, alcoólise e aminólise (SUN et al., 2009; MARTINS et al., 2008).

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

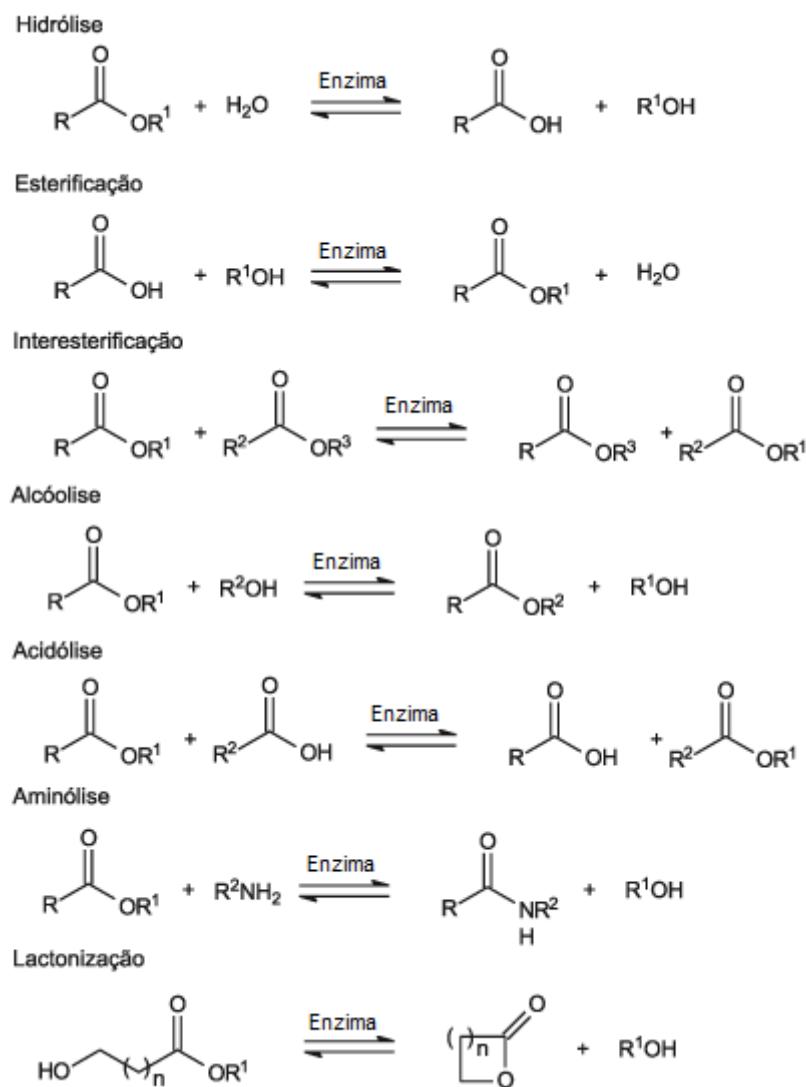
O seu mecanismo de ação é baseado nos sítios ativos presentes, formados pela tríade de aminoácidos serina-histidina-aspartato/glutamato. Sendo assim, é necessário que uma “ativação interfacial” ocorra para que se inicie a catálise (BON & FERRARA, 2008). A estrutura tridimensional da lipase justifica essa ativação. O sítio ativo das lipases é coberto por uma superfície entrelaçada, denominada de tampa (ou borda). Quando há ligação do substrato na superfície da enzima, esta tampa move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, com o centro ativo agora acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica, facilitando a ligação da lipase ao substrato (CASTRO et al., 2004).

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

As lipases podem ser encontradas em células de tecidos animais e vegetais e ainda podem ser produzidas por micro-organismos (SAXENA *et al.*, 2003). Segundo Vulfson (1994), apesar das enzimas lipolíticas serem mais extensamente encontradas em plantas, o seu conhecimento é bastante limitado se comparado com as lipases de micro-organismos e animais. Do ponto de vista industrial as lipases microbianas são consideradas de maior importância, por apresentarem procedimentos mais simples de obtenção, a partir do caldo fermentativo, e serem geralmente mais estáveis e possuirem propriedades mais diversificadas (GANDRA *et al.*, 2008; PASTORE *et al.*, 2003).

Embora a lipase pancreática seja a mais estudada até hoje, do ponto de vista industrial, as lipases microbianas são bem mais interessantes por permitirem produção em maior escala e por serem facilmente expressas, via clonagem, em outros organismos, facilitando sua obtenção e purificação (PALEKAR *et al.*, 2000).

A Figura 2.1 apresenta os diferentes tipos de reações catalisadas por lipases.



**Figura 2.1** – Reações catalisadas por lipases (PAQUES & MACEDO, 2006)

### 2.1.1. Lipases de Origem Microbiana

As lipases são utilizadas há milhares de anos, da maneira direta, empregando o extrato enzimático bruto de origem animal ou vegetal e, da maneira indireta, pelo aproveitamento da ação enzimática pelo crescimento microbiano em determinados substratos. A produção e aplicação de enzimas de origem microbiana, de maneira controlada, tem tido maior enfoque na indústria biotecnológica (JAEGER & EGGERT, 2002).

As enzimas microbianas são muitas vezes mais úteis do que as enzimas derivadas de plantas ou animais devido à sua grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, os

possíveis rendimentos elevados, a facilidade na manipulação genética e o rápido crescimento microbiano em um meio de baixo custo (HASAN *et al.*, 2006).

Devido à ampla perspectiva de aplicação industrial e a estabilidade, as lipases de origem microbiana estão sendo muito estudadas, uma vez que permitem um maior controle e eficiência, características difíceis de serem obtidas com lipases de outras fontes. Além disso, a produção de enzimas por micro-organismos garante um potencial ilimitado de suprimentos, possibilitando a criação de novos sistemas enzimáticos, o que não pode ser obtido em fontes vegetais e animais (JESUS *et al.*, 1999; ALVES *et al.*, 2002)

Apesar da sua versatilidade, os micro-organismos são bastante sensíveis às condições do ambiente ao qual estão sendo submetidos. Na produção de enzimas lipolíticas microbianas, fatores como composição do meio, temperatura, pH, aeração e a presença de compostos inibidores influenciam no processo, afetando a atividade enzimática. Uma grande variedade de micro-organismos tem habilidade de produzir essas enzimas, apresentando diferentes especificidades, massa molecular, sensibilidade à temperatura e pH (BURKERT, 2003).

O aumento do rendimento das células se dá pelas manipulações genéticas ou ambientais, acarretando num aumento da atividade enzimática, que torna a enzima de interesse constitutivo, ou seja, induzindo-a a produzir enzimas alteradas que possam ser facilmente empregadas, devido as suas relativamente simples necessidades nutricionais (JAEGER *et al.*, 1994).

A quantidade de enzima produzida, o processo de separação empregado e a estabilidade enzimática, determinam o custo de produção das enzimas lipolíticas microbianas. O substrato utilizado como fonte de carbono e o tipo de indutor influenciam significativamente a produção destas enzimas microbianas durante a fermentação. Isso acontece porque as enzimas lipolíticas têm como função quebrar os substratos lipídicos insolúveis para poderem ser mais facilmente absorvidos, já que a maioria das enzimas microbianas é produzida extracelularmente (KANWAR *et al.*, 2002; FEITOSA, 2009).

Os fungos filamentosos são reconhecidos como sendo os melhores produtores de lipases (CARDENAS *et al.*, 2001). As espécies destes tipos de fungos maiores produtoras de lipase pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* e *Thermomyces* (OLIVEIRA, 2006). Dentre as leveduras produtoras, a *Candida rugosa* é a que mais tem sido empregada em processos industriais (HADEBALL, 1991).

### **2.1.1.1. Lipases de *Candida rugosa***

*Candida rugosa*, também denominada *Candida cylindracea*, é uma levedura que apresenta formato esférico, forma colônias rugosas de coloração de branca a creme e se reproduz principalmente por brotamento multilateral, podendo apresentar ramificações e pseudohifas. Apresenta temperatura ótima de crescimento variável entre 20 e 30°C. Requer, para seu crescimento, além de uma fonte de carbono, macronutrientes como enxofre, potássio e nitrogênio. Embora possa ser patógena quando presente na corrente sanguínea, raramente causa infecção (SCHAECHTER, 2009; BENJAMIN, PANDEY, 1998; DIB et al., 1996; PFALLER et al., 2006).

*Candida rugosa* produz lipases não específicas que catalisam a hidrólise das moléculas de acilglicerol de maneira aleatória, produzindo, assim, ácidos graxos livres, glicerol, mono e diacilgliceróis como intermediários. Neste caso, os produtos são similares aos produzidos por catálise química, porém com menor grau de termodegradação, devido à temperatura da biocatálise ser bem inferior (RICHETTI, 2009).

### **2.1.1.2. Lipases de *Geotrichum candidum***

*Geotrichum candidum* é um fungo ascomiceto de colônias brancas. Pode ser isolado de diferentes locais como solo, água, esgotos e produtos lácteos. Estirpes comerciais são usadas como culturas iniciadoras na fabricação de queijos, exercendo influência também sobre a maturação destes. É capaz de crescer em ampla faixa de temperatura e pH, com temperatura ótima de aproximadamente 25°C. Observam-se três morfologias básicas para este micro-organismo: estirpes que se assemelham a colônias de leveduras e apresentam baixa atividade proteolítica; colônias brancas que se assemelham a fungos filamentosos, com predominância de hifas e alta atividade proteolítica; e as que se situam entre estas situações (MARCELINO et al, 2001; HAYALOGLU & KIRBAG, 2007; BOUTROU & GUÉGUEN, 2005, MEDVED'OVÁ et al., 2008).

*Geotrichum candidum* produz lipases ácido-graxo específicas que atuam na hidrólise de ésteres, cujos ácidos graxos são de cadeia longa insaturada com duplas ligações, em *cis* e no carbono 9, lentamente hidrolisados. Esta especificidade não é comum entre as lipases, por isso as produzidas por *Geotrichum candidum* são as mais estudadas. Além disso, esta habilidade de produzir novos tipos de misturas de triacilgliceróis utilizando lipases

regioespecíficas é uma das características mais interessantes para a aplicação no setor de óleos e gorduras (CASTRO et al., 2004).

### 2.1.2. Aplicações das Lipases

Têm-se utilizado lipases em muitas aplicações promissoras de variados segmentos biotecnológicos, como no processamento de papel e celulose (SHARMA et al. 2001), na indústria de alimentos (BUSTAMANTE et al., 2003), na indústria têxtil e de cosméticos (HASAN et al., 2006), no tratamento biológico de resíduos (ROSA et al., 2006), na indústria de detergentes (LIU et al, 2008), oleoquímica (MATSUOKA et al., 2009), farmacêutica e química fina (VIEIRA et al., 2009). Sua alta capacidade catalítica permite que elas sejam utilizadas na resolução estereosseletiva de alcoóis, ácidos carboxílicos e aminas ou na síntese regiosseletiva, originando produtos opticamente ativos e ampliando a aplicação comercial (BON et al., 2008). O mercado industrial das lipases se divide em três segmentos de aplicação: na área tecnológica, na indústria de alimentos e para ração animal.

As lipases representam cerca de 10% entre as enzimas empregadas em processos bioquímicos reportados na literatura. Porém, mesmo com esta vasta variedade de lipases de origens microbianas, o uso dessas enzimas em escala industrial ainda é escasso, devido aos elevados custos de produção (FEITOSA, 2009).

No processamento de papel e celulose, as lipases são utilizadas para hidrolisar mais que 90% dos triglicerídeos presentes na madeira, que causam graves problemas na fabricação de celulose e papel (SHARMA et al., 2001).

Na indústria alimentícia, as lipases são utilizadas na melhoria da textura de pães, otimização do tempo de maturação de salsichas fermentadas, na hidrólise de gorduras e até mesmo na alteração do sabor do leite (BON & FERRARA, 2008; GANDRA et al., 2008).

As lipases são utilizadas na indústria têxtil para remover lubrificantes, proporcionando um tecido mais absorvente o que ajuda no seu tingimento. Alta resistência a manchas, enrugamentos, abrasão e suavidade são algumas vantagens que podem ser atribuídas à essas enzimas, no processamento de tecidos sintéticos (HASAN et al., 2006).

Retinóides (vitamina A e derivados) são muito empregados na indústria de cosméticos. Em produtos para cuidados com a pele, os derivados de retinol, solúvel em água, são preparados por reações catalisadas por lipases imobilizadas (HASAN et al., 2006).

No tratamento biológico de resíduos, as lipases são utilizadas em resíduos domésticos, na limpeza de tubulações de esgotos, fossas sépticas e sumidouros e até mesmo para acelerar a biodegradação de polímeros e lamas de perfuração de poços de petróleo contendo ésteres sintéticos emulsionados em água (JAEGER e REETZ, 1998; BON & FERRARA, 2008).

A utilização de lipases na indústria de detergentes ocorre desde os anos 90 e é considerada, atualmente, a maior aplicação destas enzimas, sendo responsáveis por aproximadamente 32% das vendas totais das lipases. Isso se deve principalmente à sua característica de suportar ampla faixa de pH e temperatura branda submetido durante o processo de lavagem (BON et al., 2008; LIU et al., 2008).

Entre as aplicações na indústria oleoquímica, a interesterificação de óleos merece destaque, por ajudar na produção de um óleo mais barato devido à composição em ácidos graxos (CABRAL et al., 2003). Segundo Lee et al. (2002), estudos envolvendo a aplicação de lipases na obtenção do biodiesel, via rota enzimática, aumentou significativamente nos últimos anos. O biodiesel é formado pelos ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, que podem ser utilizados como misturas e empregados como combustível, sem a desvantagem de gerar óxidos de enxofre e de particulados. A lipase catalisa a reação do álcool com óleos vegetais e gordura animal. Como várias matérias-primas agropecuárias são ricas em óleos e gorduras, sua aplicação como fonte de biocombustíveis se torna notável e importante na área tecnológica, social e econômica. Além disso, se comparada à rota química, a rota enzimática facilita na recuperação de ésteres etílicos e metílicos (biodiesel) e diminui a quantidade de subprodutos gerados (glicerol), eliminando a geração de resíduos (YANG et al., 2007).

Na indústria farmacêutica e química fina, o potencial das lipases é conferido por sua característica de regio, enantio e quimiosseletividade, permitindo serem utilizadas na resolução de misturas racêmicas e na remoção seletiva de alguns compostos indesejáveis (CABRAL et al., 2003)

Por outro lado, as lipases também podem ser empregadas como biossensores para a detecção de triacilgliceróis na indústria oleoquímica, na tecnologia de alimentos e em análises clínicas (BON & FERRARA, 2008).

A Tabela 2.1 apresenta algumas aplicações industriais das lipases (MALDONADO, 2006)

**Tabela 2.1** – Aplicações industriais de lipases

Indústria	Aplicação
Laticínio	Hidrólise de gordura do leite
Panificação	Aumento do aroma e da vida de prateleira
Cervejaria	Aceleração da fermentação em função dos lipídeos
Carne	Desenvolvimento do aroma e remoção do excesso de gordura
Alimentícia	Digestão de óleos e gorduras em alimentos
Médica	Determinação de triglicerídeos no sangue
Papel	Tratamento de polpas de celulose
Tratamento de resíduos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas

**Fonte:** MALDONADO, 2006.

A especificidade da lipase é um fator muito importante para a aplicação industrial. Esta enzima pode ser específica com relação à molécula alcoólica ou ácida do substrato. As lipases são divididas baseando-se na sua especificidade.

Lipases não específicas (ex.: produzidas por *Candida rugosa*) catalisam a quebra das moléculas de acilglicerol de maneira aleatória, produzindo intermediários como ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis. Neste caso, devido à temperatura na biocatálise ser bastante inferior, os produtos gerados possuem menor termodegradação, apesar da sua similaridade com os produzidos por catálise química (WOLSKI, 2008).

Lipases 1,3 específicas (ex.: produzidas por *Aspergillus niger*) são classificadas desta maneira por liberarem ácidos graxos nas posições 1 e 3, formando produtos com diferentes composições das obtidas por lipases não-regiosseletivas (WOLSKI, 2008).

E por fim, as lipases ácido graxo específicas (ex.: produzidas por *Geotrichum candidum*) que têm ação específica durante a hidrólise de ésteres. A habilidade de produzir novos tipos de misturas de triacilglicerídeos utilizando lipases regioespecíficas é uma das características mais importantes para serem aplicadas no setor de óleos e gorduras (CASTRO et al., 2004).

Devido à versatilidade das lipases, aliada ao desenvolvimento dos conhecimentos e técnicas associadas à biologia molecular dos micro-organismos, sua aplicação será ampliada consideravelmente nos próximos anos (SHARMA et al., 2001).

### **2.1.3. Reações Catalisadas por Lipases**

Lipases são enzimas solúveis em água e catalisam reações hidrolíticas de triglicerídeos insolúveis, atuando somente na interface óleo-água, por isso não obedecem às equações de Michaelis-Menten para a cinética enzimática, que são válidas apenas para reações catalíticas que ocorrem em fase homogênea. Sendo assim, as reações catalisadas por lipases, são analisadas através de um substrato lipídico emulsionado. Por outro lado, à medida que há formação de produtos e degradação do substrato, a composição da interface óleo-água, varia na emulsão (OLIVEIRA, 2000).

A velocidade da reação é determinada pela área superficial da emulsão nas partículas por unidade de volume, e não pela concentração de lipídeos na emulsão (triacilglicerol). A estabilidade da emulsão e o tamanho de suas partículas, influenciam a produção de lipase (atividade lipolítica) e, indiretamente, a taxa de crescimento do micro-organismo produtor (HADEBALL, 1991).

É importante que, na emulsão do substrato, haja uma interface ampla e estável de gotículas lipídicas para o ensaio de atividade lipolítica, pois, esta atividade, varia em função da concentração do substrato, mas também, em função do tamanho da área da interface óleo-água. Sendo assim, para se obter resultados reproduzíveis na determinação da atividade lipolítica, é fundamental que se tenha uma emulsão de óleo e água perfeitamente dispersa, homogênea e bem estabilizada (OLIVEIRA, 2000).

As interferências na interface, que refletem na atividade lipolítica, podem ser causadas por proteínas, sais biliares, ácidos graxos, mono e diacilgliceróis, resultantes do triglicerol durante a ação da lipase (HADEBALL, 1991).

## **2.2. Produção microbiana de enzimas**

Os processos fermentativos constituem um dos métodos mais antigos e extremamente utilizados para a produção de enzimas em que os micro-organismos (bactérias, fungos ou leveduras) retiram do meio fermentativo, as fontes necessárias para a sua subsistência, ao mesmo tempo em que sintetizam as enzimas para serem empregadas em processos industriais. Dois são os processos fermentativos utilizados, a fermentação em estado semi-sólido (FES)

onde o meio utilizado é sólido, e a fermentação submersa (FS), onde o meio no qual se desenvolve o micro-organismo é líquido.

O que caracteriza a produção de diferentes tipos de enzimas é o ambiente fornecido por esses dois métodos que é bem diferente em relação ao teor líquido (SATO & SUDO, 1999). Segundo Aguilar (2008), além da baixa utilização em larga escala, a fermentação em estado semi-sólido tem como desvantagens o uso, somente, de micro-organismos capazes de crescerem sob níveis reduzidos de umidade, a dificuldade em determinar parâmetros (pH, umidade, taxa de oxigênio livre e dióxido de carbono).

Após realizar uma análise econômica envolvendo as fermentações submersa e semi-sólida, para a produção média anual de 100 m<sup>3</sup> de lipase concentrada, Castilho et al. (2000) concluíram que para fermentação submersa, é necessário um investimento de 78% a mais que o necessário para a fermentação em estado semi-sólido. Contudo, a fermentação submersa supera o outro método, devido suas muitas vantagens, principalmente referente à facilidade de controle do processo. Pinheiro et al. (2008) realizaram estudos relevantes referentes à produção de lipases por fermentação submersa, mostrando a importância do uso de resíduos agroindustriais com a finalidade de diminuir o custo de produção do biocatalisador.

### **2.2.1. Fermentação em Estado Semi-Sólido (FES)**

O processo de fermentação no estado semi-sólido (FES) é uma técnica de crescimento dos micro-organismos na superfície e no interior de suporte ou matriz sólida (partículas porosas úmidas), mantendo o conteúdo de líquido, contido nesta matriz, a um nível correspondente à atividade de água. Assim, é garantido o crescimento celular que não exceda à capacidade máxima de retenção de água na matriz. O suporte sólido pode ser constituído por um substrato naturalmente úmido ou por uma matriz inerte capaz de absorver os nutrientes que se encontram em solução, reproduzindo as condições de baixa atividade de água e alta transferência de oxigênio (FEITOSA, 2009).

As vantagens da fermentação no estado semi-sólido são as seguintes: condições de cultura próximas ao dos meios naturais sendo que para as fermentações tradicionais, a microflora do suporte pode servir de inóculo; simplicidade de meio de cultura; fácil aeração devido à porosidade do material; utilização direta dos sólidos fermentados; extração facilitada pela alta concentração de produtos; baixa demanda de energia; volume do fermentador menor

do que o da cultura líquida; redução dos efluentes líquidos a tratar e redução das contaminações resultantes da baixa umidade do meio fermentativo (SPIER, 2005).

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

### **2.2.2. Fermentação Submersa (FS)**

A fermentação submersa é o processo onde é utilizado um meio fermentativo líquido contendo fontes de nutrientes solúveis e, devido à facilidade dos micro-organismos crescerem em condições controladas de pH e temperatura, é o método mais empregado para a produção de lipases.

A produção de lipase pode ser realizada em escala laboratorial por meio de reatores de bancada agitados, e também em escala industrial, em fermentadores industriais. (ELLAIAH et al., 2004; KANWAR et al., 2002; MAHADIK, 2004; MAIA et al., 2001).

As fermentações podem ocorrer na forma contínua, semi-contínua ou descontínua. Segundo Pinheiro (2006), no regime contínuo há uma constância na entrada de substrato e na saída do meio fermentado, conforme as necessidades do micro-organismo. Para Koutinas et al. (2003), Shu et al. (2006) e Li et al. (2001), os processos descontínuos podem ser conduzidos na forma de batelada, ou seja, quando quantidades únicas de substrato são fornecidas ao micro-organismo no início da fermentação. Devido ao seu baixo custo, este processo é bastante utilizado na produção de enzimas lipolíticas, porém é necessário um maior controle operacional para assegurar a reproduzibilidade e constância das propriedades do produto.

Como dito anteriormente, a maior desvantagem da fermentação submersa em relação à fermentação no estado sólido é o investimento econômico, devido aos meios utilizados no preparo da fermentação submersa apresentarem alto custo. Soccol et al. (2003), observaram que a fermentação em estado semi-sólido utilizam meio extremamente baratos, porém, a

possibilidade de uso de resíduos agroindustriais como substrato e a produtividade que a fermentação submersa apresenta, faz com diminua, assim, o custo de obtenção da enzima.

No entanto faltam ainda os mecanismos de controle sofisticados existentes na fermentação submersa, pois na literatura ainda são poucos os modelos de biorreatores disponíveis para fermentação no estado sólido que consigam o controle de parâmetros como pH, temperatura, aeração, umidade e transferência de oxigênio. (SANROMÁN & COUTO, 2006).

Muitos estudos têm sido realizados afim de definir as necessidades nutricionais e de cultura ideal para a produção de lipases em fermentação submersa (HASAN et al., 2006). SANROMÁN & COUTO (2006), afirmam que o processo de fermentação submersa é relativamente mais fácil de ser aplicado em escala industrial, já que garante homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros como pH, temperatura, aeração, umidade e concentração de oxigênio dissolvido no processo, principalmente se monitorados por sensores adequados.

MAIA et al. (1999), estudaram a produção de lipase extracelular pelo fungo *Fusarium solani* FS1 em fermentação submersa, utilizando como meio basal: 1,0 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 7 g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 3 g/L de NaNO<sub>3</sub> e 30 g/L de peptona, suplementado com diferentes fontes de carbono (glicose, óleo de oliva e peptona). O fungo produziu 10,50 U/mL de lipase após 72 horas de incubação a 25°C e agitação de 120 rpm em meio contendo 3% (m/v) de peptona e 0,5% (v/v) de óleo de oliva. Já a glicose (1% m/v) inibiu o efeito estimulador do óleo de oliva.

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

A influência de três tipos de óleos (coco, mamona e oliva) como indutores e fontes de carbono na produção de lipase por bactéria isolada de solo contaminado por petróleo foi avaliada por Carvalho et al. (2008). No estudo observaram que o óleo de coco produziu lipases com maior atividade (1,675 U/mL).

Kumari et al. (2009) realizaram a otimização estatística das condições de cultura para a produção de lipase utilizando o micro-organismo *Enterobacter aerogenes*. Os parâmetros avaliados no estudo foram temperatura, concentração do óleo, volume do inóculo, pH e o tempo de incubação. Os resultados obtidos mostraram que a melhor condição para a produção

de lipase foi temperatura de 34°C, 3% de óleo, 7% de volume de inóculo, pH 7,0 e 60 horas de incubação, na qual foi obtida uma atividade lipolítica máxima de 27,25 U/mL.

No estudo da produção de lipases por *Penicillium verrucosum* em fermentação submersa utilizando meio convencional (peptona, extrato de levedura, NaCl e óleo de oliva) e industrial (água de maceração de milho, Prodex Lac - hidrolisado de levedura, NaCl e óleo de oliva), Barbosa (2011) avaliou a cinética de produção de lipases de *Bacillus sp* e as atividades enzimáticas mais elevadas para meio convencional e meio industrial foram de 3,15 e 2,22 U/mL, respectivamente, tendo, para ambos uma atividade ótima no intervalo de 30 a 40°C e em pH 7,0.

### **2.3. Influência do meio na Produção de Lipase**

Na produção de lipase microbiana, além da escolha do melhor tipo de fermentação (submersa ou semi-sólida), é necessário uma avaliação sobre o meio de cultura utilizado para o crescimento microbiano. Estes meios de cultura são formulados utilizando-se compostos quimicamente conhecidos ou matérias-primas naturais (LIMA et al., 2007).

As variáveis que influenciam no processo de obtenção da enzima envolvem desde a composição do meio (fonte de carbono, fonte de nitrogênio, sais e indutores) até às condições operacionais como pH, temperatura, agitação e aeração (BURKERT et al., 2003). Segundo Borzani et al. (2001), isto ocorre devido à estrutura e a forma do sítio ativo da enzima, podendo ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura proteica.

Os efeitos destes fatores afetam diretamente todos os tipos de micro-organismos produtores de lipase, por isso, é necessário estudar a influência dos fatores para se obter uma condição ótima de produção da lipase.

Interfaces líquido-líquido e uma intensa agitação nos biorreatores são frequentes durante a hidrólise de lipases ajudando a fornecer uma área interfacial adequada (ROONEY & WEATHERLEY, 2001). Outros fatores que também são determinantes para a manifestação da atividade lipolítica são os fatores físicos como pressão atmosférica e distribuição dos lipídeos (GONÇALVES, 2007).

Segundo Zarevucka et al. (2005), o nível máximo da produção de lipase é atingido na fase estacionária de crescimento, diminuindo, rapidamente após alcançar esse nível. Isso

ocorre devido à catálise da proteólise pelas proteases produzidas na fase de crescimento celular (Dalmau et al., 2000).

### **2.3.1. pH**

O pH do meio de fermentação desempenha uma função importante por induzir mudanças morfológicas no micro-organismo e também para a secreção enzimática. A mudança de pH observada durante o crescimento de um micro-organismo também afeta a estabilidade do produto no meio. Segundo Gupta et al. (2004), em processos com fungos, alguns constituintes do meio possuem comportamento similar ao de tampões, eliminando a necessidade de controlar o pH.

Cada micro-organismo apresenta um valor de pH ótimo para seu crescimento e, muitas vezes, não é o mesmo para a produção de lipase. Porém, podem ocorrer variações nos valores de pH durante o cultivo, os quais são influenciados tanto pelo micro-organismo e pela composição do meio, quanto pelos demais parâmetros da fermentação (PINHEIRO, 2006).

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

### **2.3.2. Temperatura**

A temperatura influencia diretamente na cinética da reação enzimática devendo ser analisada em duas fases diferentes: a princípio, o aumento da temperatura eleva a energia cinética das moléculas dos componentes do sistema, aumentando, assim, os choques efetivos entre elas, e isso faz com que a reação acelere. Esse efeito é observado no intervalo de temperatura compatível com a manutenção da estrutura espacial da enzima (FEITOSA, 2009).

Por outro lado, altas temperaturas levam à desnaturação da enzima, causando a perda da estrutura nativa das enzimas devido às alterações nas ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional. As ligações de hidrogênio são bastante termolábeis e seu

rompimento desencadeia uma série de alterações estruturais, levando a enzima a uma nova conformação ou a um estado sem estrutura definida. Assim, a enzima é dita, desnaturada. A temperatura que provoca a desnaturação naturalmente varia para a cadeia proteica, mas, geralmente, está pouco acima da sua temperatura ótima (BORZANI et al., 2001).

Os efeitos da temperatura na atividade enzimática foram testados por Castilho et al. (2005), durante a purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por *Rhizopus sp*, as temperaturas foram de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 e 70°C, concluindo que a temperatura ótima para a lipase bruta é de 40° C, mantendo 50% ou mais de sua atividade entre 40 e 55°C.

Burkert et al. (2004) verificaram que a lipase produzida por *Geotrichum candidum* apresentou condições ótimas de atividade a 37°C e observaram que a estabilidade da lipase é maior em baixas temperaturas, como por exemplo a de 30°C.

### 2.3.3. Fonte de Carbono

O carbono é o principal componente da célula e muitas de suas fontes podem ser utilizadas no cultivo de micro-organismos para a produção de lipases, como por exemplo, fontes sintéticas (glicose, xilose, maltose, lactose, sacarose, carboximetilcelulose, xilano de aveia, pectina de citrus, glicerol e glicose) e fontes naturais (bagaço de cana, bagaço de laranja, farelo de aveia, farelo de trigo, óleo de soja, óleo de pescado, borra de óleo de soja) (KNOB et al., 2007).

Segundo Tan et al. (2003), além do carbono, essas fontes são consideradas indutoras da produção de lipase por micro-organismos. A presença da lipase permite ao micro-organismo utilizar os lipídeos de fonte animal e vegetal como energia e fonte de carbono para o seu crescimento.

A fonte de carbono no meio fermentativo afeta, diretamente, a produção de lipase, sendo as mais usuais os carboidratos, os ácidos orgânicos, os gliceróis, outros alcoóis e ácidos graxos (HADEBALL, 1991).

Tem-se empregado meios de cultura líquida suplementados com compostos lipídicos para obtenção de lipase com rendimento elevado. A atividade lipolítica tem sido detectada em meio fermentativo contendo substratos lipídicos o que faz com que a enzima seja induzida por esses substratos (DEIVE et al., 2003).

Substratos lipídicos e seus metabólicos (ácidos graxos de cadeia longa) participam da síntese da lipase. Outros substratos, como os carboidratos, apesar de proporcionarem bom crescimento celular, não são bons para a síntese da lipase (DALMAU et al., 2000).

*Candida rugosa* produz a lipase mesmo sem a presença de um indutor, porém em menor quantidade se comparada à presença desta fonte de carbono como indutor (LOTTI et al., 1998).

Dalmau et al. (2000), analisaram os efeitos das fontes de carbono na produção de lipase por *Candida rugosa* utilizando para uma concentração de 2 g/L, ácido oléico, ácido palmítico, Tween 80 e trioleína. Após os testes verificaram que o ácido palmítico foi o melhor indutor para a produção da enzima nas condições de 30°C, 150 rpm em 48 horas de fermentação, gerando cerca de 5,3 U/mL.

Pastore et al. (2003) encontraram diferentes resultados avaliando o extrato bruto enzimático produzido por *Rhizopus sp.* que apresentou maiores valores de hidrólise para a gordura de coco quando comparado ao óleo de oliva e a gordura do leite de cabra, indicando uma boa afinidade dos ácidos graxos saturados de cadeia média.

Segundo Deive et al. (2003) meios de cultura contendo ácido oleico e tributirina proporcionaram um bom crescimento de *Kluyveromyces marxianus*. Neste caso, o ácido oleico demonstrou ser uma boa fonte de carbono para levedura, apesar de ter promovido o aparecimento de outras atividades enzimáticas. No entanto, a tributirina mostrou-se um bom indutor de produção da lipase, devido à possível preferência da enzima para triacilgliceróis formados por ácidos graxos de cadeia curta (DEIVE et al., 2003).

Após testar vários óleos, triglycerídeos e ácidos graxos, Ginalska et al. (2004) concluíram que a trioleína permitiu uma produção máxima de lipase por uma cepa de *Geotrichum*. Porém, os óleos de soja, de oliva e de colza também demonstraram serem efetivos na produção de lipase. Na presença de triacilglicerídeos de ácidos graxos saturados de cadeia curta (tributirina e tricaprilina), a cepa de *Geotrichum* produziu uma quantidade bem menor de lipase.

### **2.3.4. Fonte de Nitrogênio**

O nitrogênio é um componente que tem mostrado grande influência na produção de lipases. Fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico apresentam um importante papel na síntese desta enzima (TAN et al.; 2003). As fontes de nitrogênio mais comuns empregadas na

produção de lipase são os ácidos hidrolisados de proteínas, água de maceração de milho, farinha de soja, peptonas, aminoácidos; uréia, nitrato e sais de amônia (GONÇALVES, 2007). A seleção da fonte de nitrogênio mais adequada depende do micro-organismo usado e da associação com outros ingredientes do meio de cultura (MONTESINOS et al., 1996). Segundo Becker et al. (1997), as fontes de nitrogênio já presentes no meio de cultura contêm algumas, senão todas as vitaminas necessárias para o metabolismo do micro-organismo.

Geralmente os micro-organismos apresentam alta produção de lipase quando é utilizada fonte orgânica de nitrogênio sendo que a uréia foi considerada a melhor fonte deste nutriente para a produção da lipase por *Geotrichum* (GINALSKA et al., 2004).

A partir do estudo dos efeitos das fontes de carbono e nitrogênio na produção de lipase por *Candida rugosa*, Fadiloglu & Erkmen (2002), utilizaram como fonte de carbono, glicose e frutose e como fonte de nitrogênio, extrato de levedura, triptona, e peptona. Após 72 horas de fermentação, avaliaram-se os efeitos do meio fermentativo na produção de lipase com e sem azeite de oliva, em diferentes composições das fontes de carbono e nitrogênio. A maior atividade da lipase foi observada no meio que continha o azeite de oliva como indutor e extrato de levedura e peptona como fonte de nitrogênio. Então, os autores chegaram à conclusão que os melhores resultados foram com o meio contendo o óleo de oliva como fonte de carbono, na presença de fontes de nitrogênio, como extrato de levedura, tritona e a peptona.

Tan et al. (2003) mostraram que a soja e a caseína foram as melhores fontes de nitrogênio orgânico na produção de lipase por *Candida sp*. A soja contém além da proteína o óleo que atua como um indutor favorecendo a síntese de lipase. Dentre as fontes de nitrogênio inorgânico testadas, o sulfato de amônio apresentou melhores resultados.

Para Fickers et al. (2004), as fontes de nitrogênio mineral não demonstraram efeito significante no crescimento da levedura e na produção de lipase. Porém, em meios contendo determinadas fontes de nitrogênio orgânico, observou-se um aumento da produção de lipase. A maior produção de lipase foi obtida na presença de caseína hidrolisada, que se sobressaiu em relação aos outros substratos de nitrogênio orgânico e mineral.

### **2.3.5. Agitação**

Com base na literatura, muitos estudos demonstram que a agitação é um parâmetro que influencia diretamente na produção de lipases.

Na produção de lipases ácidas pelo micro-organismo mutante de *Aspergillus niger* em fermentação submersa, Mahadik et al. (2004), variaram a velocidade de agitação entre 150 e 180 rpm, à 30°C e pH 5,5, atingindo uma atividade lipolítica máxima de 25,8 U/mL.

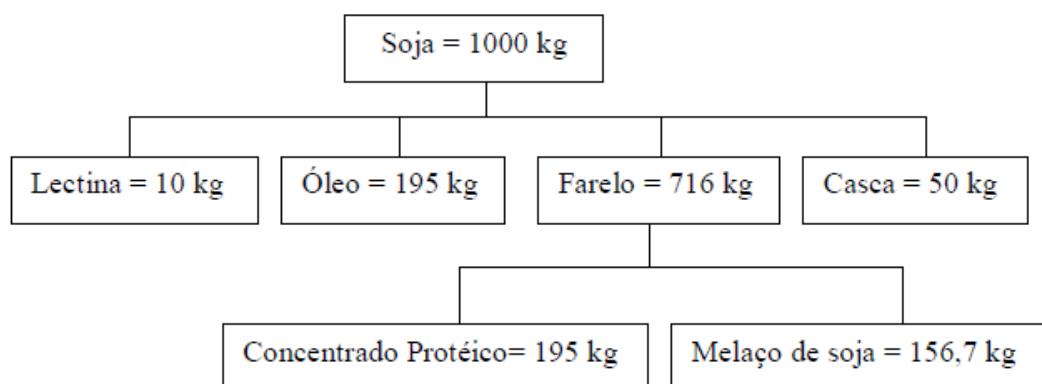
Tumang & Costa et al. (2006), estudaram a produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*, também em fermentação submersa, com uma agitação de 160 rpm, numa temperatura de 30° C e pH 6,0 obtendo uma atividade lipolítica de 1,20 U/mL.

Diaz et al. (2006), produziram lipase do fungo termotolerante de *Rhizopus homothallicus* em fermentação submersa utilizando meio de cultura com pH 6,5, temperatura de fermentação de 40° C e uma velocidade de agitação de 170 rpm e obtiveram uma atividade lipolítica máxima de 50 U/mL.

Por sua vez Shu et al. (2006), obtiveram uma atividade lipolítica máxima de 26 U/mL utilizando lipase de *Antrodia cinnamomea* a uma velocidade de agitação de 150 rpm, temperatura de 28° C e pH 4,0.

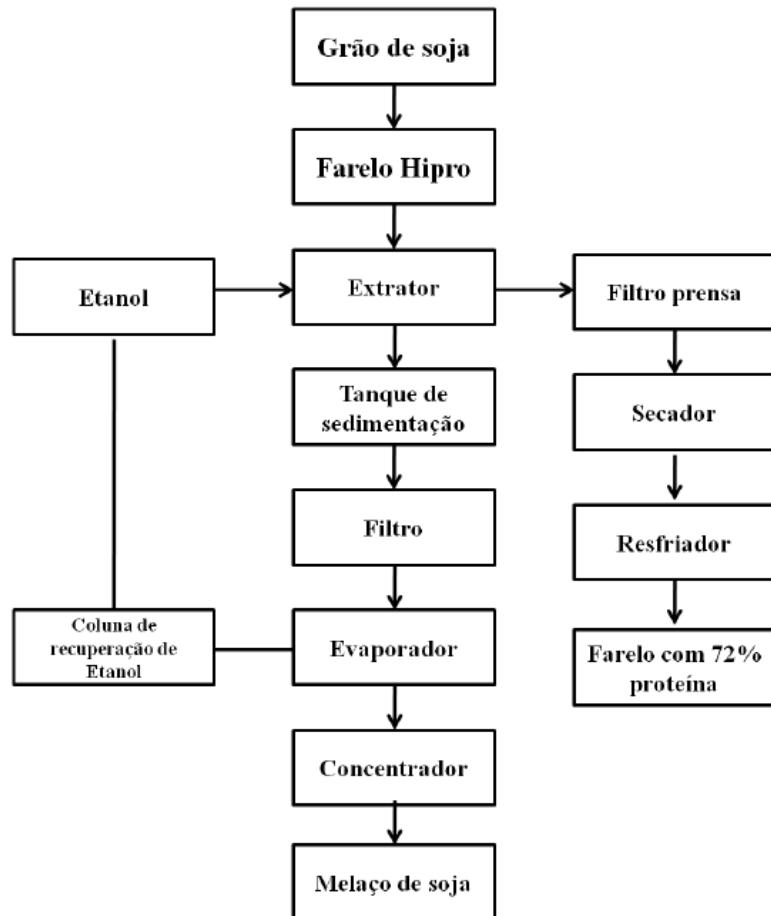
## 2.4. O Melaço de Soja

Segundo Siqueira (2007) para cada tonelada de soja processada obtém-se 716 kg de farelo que são utilizados para a obtenção de concentrados protéicos, sendo gerados 156,07 kg de melaço de soja. A Figura 2.2 mostra o balanço de massa para o processamento da soja.



**Figura 2.2** - Fluxograma do balanço de massa para processamento da soja (adaptado SIQUEIRA, 2007).

O melaço de soja é um co-produto gerado pela evaporação do líquido remanescente da secagem da proteína concentrada de soja (MACHADO, 1999) conforme esquematizado na Figura 2.3.



**Figura 2.3 - Fluxograma da produção de farelo concentrado de soja (72% de proteína).**

Adaptado de Silva (2011).

No processo de obtenção do farelo concentrado de soja a partir do farelo hipro (48% de proteína), acontece uma extração com etanol. Da corrente alcoólica, que contém as proteínas, obtém-se o farelo concentrado. A outra corrente líquida, rica em açúcares, passa por um processo de separação de sólidos e de evaporação, recuperando o etanol, o líquido remanescente concentrado é chamado melaço de soja (SILVA, 2011).

A Tabela 2.2 apresenta os componentes encontrados em maior quantidade, após caracterização em amostras de melaço de soja, e a porcentagem de cada um deles em base seca.

**Tabela 2.2 - Composição média do melaço de soja.**

<b>Componentes</b>	<b>% em base seca</b>
Carboidratos Totais	57,3
Glicose	0,243
Frutose	0,127
Galactose	0,254
Sacarose	28,4
Lactose	-
Rafinose	9,68
Estaqiouse	18,6
Proteínas	9,44
Lipídeos	21,2
Fibras	5,7
Cinzas	6,36

**Fonte:** SIQUEIRA, 2007.

## 2.5. Purificação Enzimática

Enzimas comerciais são disponíveis desde preparações enzimáticas brutas até enzimas altamente purificadas (BON & FERRARA, 2008). Sua aplicação depende do seu grau de pureza, fazendo com que a purificação seja uma etapa essencial para o estudo das propriedades biológicas e moleculares desses biocatalisadores. A ausência ou o reduzido grau de impurezas contribui para um espectro mais amplo de aplicações da enzima e um alto nível de atividade enzimática, permitindo a utilização de pequenas quantidades da enzima. De acordo com Fedatto (2004), a função da purificação é isolar as enzimas específicas a partir de um extrato bruto de células contendo muitos outros componentes, resultando num caldo enzimático com a melhor recuperação possível da atividade inicial, tendo assim uma máxima de atividade específica. Um problema significante da purificação é devido a complexidade estrutural das lipases e a necessidade de manter as suas propriedades biológicas após a aplicação da técnica de purificação (BASSANI et al., 2010).

Diaz et al. (2006) afirmam que os progressos nos estudos envolvendo as propriedades moleculares da lipase têm sido bastante limitados devido à falta de procedimentos experimentais adequados para a obtenção de uma enzima altamente purificada.

Diversos métodos são utilizados para a separação de proteínas. Lehninger (1993) classificou os métodos da seguinte forma:

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

Desses métodos citados acima, o de separação por precipitação de enzimas por salificação (*salting-out*) é um método acessível e de baixo custo. Os sais aumentam a solubilidade de muitas enzimas (proteínas), em concentrações reduzidas, um fenômeno denominado solubilização por salificação (*salting-in*). Isso ocorre devido aos íons ficarem em volta das proteínas (íons de carga oposta), diminuindo a energia eletrostática e aumentando a atividade do solvente, que por sua vez, leva ao aumento da solubilidade do solvente (USA, 2012). Por outro lado, conforme a quantidade de íons de sal (força iônica) aumenta, a solubilidade do solvente diminui, reduzindo gradativamente a proteína. Uma proteína pode ser quase completamente precipitada em uma solução devido às forças iônicas suficientemente elevadas, este efeito é denominado precipitação por salificação (*salting-out*) (USA, 2012).

O objetivo de se utilizar a precipitação é remover contaminantes não protéicos e proteínas que não sejam as de interesse. A precipitação faz com que as proteínas sejam separadas pela conversão de proteínas solúveis para um estado insolúvel (FEDATTO, 2004).

Abbas et al. (2002), com a finalidade de estudar o isolamento e a caracterização de uma lipase extracelular de uma cepa isolada de *Mucor sp* de palma de frutas, utilizaram para a precipitação da proteína 75% de sulfato de amônio (m/v) a 0° C, obtendo uma atividade lipolítica específica de 129 U/g e um rendimento total de 99%. Uma atividade específica semelhante foi verificada no estudo de Castilho et al. (2005) para a purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp*, onde utilizaram o sulfato de amônio a 70% para a precipitação e obtiveram uma atividade específica de 103 U/g.

Saxena et al. (2003) realizaram um estudo envolvendo métodos de purificação e observaram que cerca de 80% desses métodos utilizam a etapa de precipitação, dos quais, 60% utilizam sulfato de amônio e 35% utilizam etanol, acetona ou um ácido, seguido pela combinação de algum método cromatográfico. Entre os métodos cromatográficos, a cromatografia de troca iônica é a mais utilizada correspondendo a 67% do total. O segundo método mais utilizado é a filtração por gel (60%), seguida pela cromatografia de afinidade (27%) e, finalmente, cromatografia de interação hidrofóbica (18%), outro método cromatográfico, com menor aplicação para purificação de lipases.

Koblitz e Pastore (2004) realizaram a purificação parcial da lipase, produzida por *Rhizopus sp.*, por meio de dois métodos cromatográficos: troca aniônica (DEAE Sepharose) e interação hidrofóbica (fenil Sepharose). Os resultados indicaram que a cromatografia por troca iônica, embora mais seletiva para a enzima em questão, provocou uma redução de sua atividade, enquanto que o método de cromatografia de interação hidrofóbica, pela presença de maiores concentrações de Na<sup>+</sup>, contribui no aumento da atividade da lipase.

Com o objetivo de purificar a lipase produzida por *Bacillus coagulans* através da precipitação das proteínas com sulfato de amônio, seguida de ressuspensão e diálise com tampão tris-HCl 0,1 M, e coluna de troca aniônica (DEAE Sepharose), Kumar et al. (2005) conseguiram purificar a lipase 40 vezes e o peso molecular determinado foi de 31 kDa.

DIAZ et al. (2006), para o procedimento de purificação de lipase do fungo *Rhizopus homothallicus*, aplicaram o método de precipitação utilizando sulfato de amônio, seguida de uma coluna de butil-sepharose. O produto destas etapas passou, finalmente, pelo método de cromatografia. A atividade lipolítica aumentou com a biomassa, atingindo o máximo no final da fase exponencial de crescimento, decrescendo em seguida, atingindo o valor máximo de 50 U/mL em 22 horas de fermentação, o que corresponde a cerca de 6 mg/L de enzima pura.

Através de estudos de purificação da lipase produzida por *Bacillus cereus*, utilizando precipitação com sulfato de amônio seguida por cromatografia de interação hidrofóbica, coluna de troca aniônica e coluna CIM QA (material monolítico polimérico com alta eficiência), Chen et al. (2007) obtiveram uma purificação de 1.092 vezes associado a 18% de rendimento.

Gaur & Anshu (2008) purificaram a lipase produzida por *Pseudomonas aeruginosa* por meio da ultrafiltração em membrana (33 kDa) seguida da aplicação das enzimas, já liofilizadas, em uma coluna Sephadex G-100. Uma purificação de 8,6 vezes foi alcançada com 51,6% de rendimento.

Como vimos, o processo de purificação é fundamental na obtenção e aplicação industrial de uma enzima. Na escolha do processo de purificação enzimática deve ser considerada a necessidade de uma boa recuperação da atividade enzimática aliada a um elevado grau de pureza. Além disso, o processo deve ser simples (evitando sucessivas etapas) e barato, pois, a fase de purificação é a etapa que mais contribui para o custo total de obtenção de uma enzima (BARBOSA, 2011).

Comparando as técnicas citadas anteriormente, a partição em sistema aquoso bifásico é uma alternativa bastante eficiente para a separação e purificação de proteínas. Algumas das vantagens deste tipo de sistema são: ambiente biocompatível, baixa tensão interfacial, baixa energia, fácil aplicação em grande escala, operação contínua e alta sensibilidade no reconhecimento das interações das proteínas ligantes (SELVAKUMAR et al., 2010).

A aplicação do sistema aquoso bifásico na purificação de enzimas tem sido estudada por diversos pesquisadores, porém a quantidade de reagentes químicos consumidos, como sais e polímeros, determina a competitividade entre a extração com SAB e as outras técnicas de biosseparação. Por isso deve ser considerada a possibilidade de reutilização dos constituintes das fases no escalonamento, devido ao aumento dos custos dos componentes das fases (COIMBRA et al., 2003).

### **2.5.1. Sistema Aquoso Bifásico (SAB)**

Soluções aquosas e solventes orgânicos aplicados em extração líquido-líquido convencional não são adequadas no processo de separação de compostos de origem biológica como proteínas e células, pela baixa estabilidade destes compostos em solventes orgânicos. Uma alternativa à extração líquido-líquido tradicional, compatível com os processos de biosseparações, é a partição em sistemas aquosos bifásicos, utilizada com sucesso no isolamento de proteínas e de outros biocompostos (COIMBRA et al., 2003).

Os sistemas aquosos bifásicos (SABs) são conhecidos desde o final do século XIX, quando Beijerinck percebeu a separação espontânea em duas fases líquidas límpidas ao misturar soluções aquosas de gelatina com ágar ou amido solúvel. Muitos outros pesquisadores estudaram este sistema, porém, só em meados da década de 50, a partir dos estudos feitos por Albertsson, ficou evidente a grande potencialidade da aplicação desta técnica para a partição/purificação de biocompostos (ZAFARANI-MOATTAR & NASIRI, 2010).

Outra propriedade termodinâmica importante associada aos SABs, e que lhes dá uma vantagem significativa quando comparados aos clássicos sistemas água/óleo, é possuírem regiões interfaciais com baixo valor de tensão interfacial (KIM & RHA, 2000; MISHIMA et al., 1998). Para aplicação nos processos de separação de biomoléculas, este pequeno valor de excesso de energia livre de Gibbs por unidade de área possibilita a transferência das biopartículas pela interface com um risco mínimo de ocorrerem alterações estruturais nas proteínas, células e membranas particionadas (RODRIGUES et al., 2003).

De forma geral, a formação dos SABs ocorre quando dois compostos hidrofílicos como polímeros (polietilenoglicol, dextrana, dentre outros) e sais (fosfatos, sulfatos, citratos, etc.) são misturados acima de certa concentração crítica resultando em duas fases imiscíveis, onde o maior constituinte é água (GARZA-MADRID et al., 2010). A Tabela 2.3 classifica as composições do SAB em quatro grupos aplicados de acordo com a biomolécula a ser purificada.

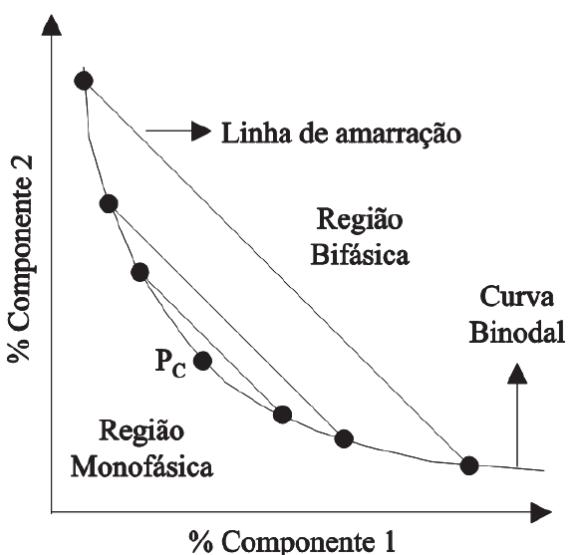
**Tabela 2.3 - Exemplos de componentes e tipos de Sistema Aquoso Bifásico**

Grupos dos Sistemas Aquosos Bifásicos	Exemplos
Dois polímeros não iônicos	Polietilenoglicol (PEG)/Ficoll PEG/Dextrana PEG/Polivinil Álcool Polipropilenoglicol (PPG)/Dextrana Metil Celulose/Hidroxipropildextrana Ficoll/Dextrana
Polieletrólito e polímero não-iônico	Sulfato Dextrana de Sódio/PPG Carboximetilcelulose de Sódio/Metil Celulose
Dois polieletrólitos	Sulfato Dextrana de Sódio/Carboximetildextrana de Sódio Carboximetildextrana de Sódio/Carboximetilcelulose de Sódio
Polímero não-iônico e composto de baixa massa molecular (SAL)	PPG/Fosfato de Potássio PEG/Fosfato de Potássio Metoxipolietilenoglicol/Fosfato de Potássio PPG/Glicose PEG/Glicose PEG/Sulfato de Magnésio PEG/Citrato de Sódio

A natureza química dos componentes formadores das fases tem forte impacto nas propriedades interfaciais dos sistemas aquosos bifásicos. Além de influenciar no coeficiente de partição dos solutos, a tensão interfacial contribui para outras propriedades do sistema, tais como a estabilidade cinética e termodinâmica da dispersão, cinética de partição, etc (SILVA & LOH, 2006).

No caso de lipases não complexadas, o estado conformacional da estrutura cristalina depende da composição e das propriedades microscópicas da solução. Em polietilenoglicol, por exemplo, obtém-se geralmente a conformação fechada, enquanto que, na presença de álcoois, obtém-se geralmente a forma aberta. Logo, as estruturas das lipases até hoje determinadas são geralmente divididas em duas categorias: as que têm o sítio ativo acessível ao solvente (estrutura aberta) e as que têm o sítio ativo inacessível ao solvente (estrutura fechada) (BON & FERRARA, 2008).

Devido ao alto teor de água, a representação gráfica dos dados termodinâmicos do SAB é geralmente realizada por meio de diagramas retangulares, como mostrado na Figura 2.4. A partir destes diagramas podem ser obtidas as composições globais do sistema, com delimitação das regiões monofásica e bifásica por meio da curva binodal. Também são representadas as linhas de amarração ou *tie-lines*, que são retas que ligam pontos no diagrama que representam a composição das duas fases em equilíbrio. Qualquer ponto sobre essa mesma linha fornecerá fases de topo e fundo com a mesma composição final, porém com diferentes relações de volumes entre as fases (SILVA & LOH, 2006). Outra particularidade dos diagramas de fases é o ponto crítico ( $P_c$ ), onde as propriedades físico-químicas das duas fases são teoricamente iguais (ALBERTSSON, 1986).



**Figura 2.4** - Esquema representativo de um diagrama de equilíbrio (SILVA & LOH, 2006).

Pesquisadores tem utilizado este tipo de sistema para a purificação de diversas biomoléculas, como albumina (YAN-MIN et al., 2010), esterase (YANG et al., 2010), protease (RAWDKUEN et al., 2010) e lipase (BASSANI et al., 2010). Segundo Rawdkuen et al. (2010), a efetividade do sal é determinada principalmente pela natureza do componente e segue a seguinte ordem de eficácia: para ânions  $\text{SO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^-$  e para cátions  $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$ .

Alves et al. (2000) estudaram a purificação de insulina suína, bastante semelhante à humana, simulando sua obtenção em um meio fermentado. A proteína foi satisfatoriamente purificada, mantendo sua atividade após o processo, o que indica o potencial de utilização desta metodologia na indústria farmacêutica.

Zuñiga et al. (2001) utilizaram 4 massas molares de PEG na partição de duas proteínas,  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina. Observaram que o aumento da massa molar do polímero aumenta a partição da  $\alpha$ -lactoalbumina para a fase inferior, enquanto que o efeito contrário ocorreu para a  $\beta$ -lactoglobulina. Dentre os sistemas testados o mais eficiente para a partição das proteínas foi composto por 18% de PEG 1500 e 18% de fosfato de potássio.

Rabelo et al. (2004), aplicaram um polímero sintético que, acima de uma determinada temperatura, apresenta miscibilidade parcial com a água, para a purificação de bromelina, uma enzima presente nos frutos do abacaxi. Após triturados os frutos, o suco obtido foi filtrado e alíquotas foram adicionadas a sistemas bifásicos. Medidas laboratoriais indicaram que houve, sob condições adequadas, uma purificação adequada da enzima diretamente a partir do seu meio de obtenção, mantendo-se boa atividade e a possibilidade de aplicação tecnológica.

Estudos realizados por Ooi et al. (2009), utilizando Sistema Aquoso Bifásico composto por álcool e solução básica de sal, revelam que estes compostos, mais precisamente iso-propanol e sulfato de amônio, são promissores na purificação de lipase.

Bassani et al. (2010) observaram o efeito do volume de exclusão ao purificar lipase liofilizada de *Candida rugosa* num sistema aquoso bifásico constituído por PEG e fosfato de potássio, onde a massa molecular variou de 2000 à 4000.

### 2.5.2. Aplicações dos Sistemas Aquosos Bifásicos

Os Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs) são aplicados com muito sucesso no processo de separação de diversas biomoléculas. Na literatura, podem-se encontrar diversos trabalhos

que evidenciam o potencial deste método na aplicação a nível industrial e que auxiliam na identificação de sistemas mais adequados à separação de biomoléculas específicas (OLIVEIRA, 2006).

Há anos os SABs são utilizados na concentração e purificação de proteínas e na bioconversão extrativa de proteínas (MA et al., 2005). Esta técnica de separação é aplicada, também, no tratamento de efluentes industriais e na indústria de papel e celulose (WAZIRI et al., 2003), na remoção de íons metálicos (GRABE et al., 2000), compostos aromáticos de óleo cru (WAZIRI et al., 2003) e poluentes orgânicos do meio ambiente (ROGERS et al., 1998).

A maior aplicação dos sistemas aquosos bifásicos tem sido na etapa de concentração e no processo de purificação de proteínas.

## CAPÍTULO 3

# MATERIAL E MÉTODOS

### **3.1. Micro-organismos**

As fermentações foram realizadas utilizando cepas de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*, cedidas pela professora doutora Eliana Setsuko Kamimura da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP.

A Figura 3.1 mostra as cepas de *Candida rugosa* (NRRL Y-1506) e *Geotrichum candidum* (NRRL Y-552) repicadas e conservadas em tubos de ensaio.

### **3.2. Meio fermentativo (Melaço de Soja)**

O substrato utilizado na fermentação para produção de lipase foi o co-produto do processo de produção do concentrado proteico de soja, denominado melaço de soja, cedido pela empresa de processamento de soja Selecta – Araguari/MG. A amostra cedida para os estudos foi colocada em frascos de 2 litros, sendo armazenados em freezer horizontal à temperatura de  $-5 \pm 1^\circ\text{C}$  (Electrolux, modelo H300) para utilização durante todo o desenvolvimento dos experimentos.

### **3.3. Testes Preliminares para a Produção de Lipase**

Foram realizados testes preliminares para a completa definição dos métodos analíticos a serem utilizados, para eliminação de possíveis causas de erros sistemáticos e definição do tempo da produção de lipase para cada micro-organismo, separadamente.

Para a determinação do tempo de fermentação de cada micro-organismo, foram realizadas fermentações em reatores de bancada com volume útil de 250 mL, cada, contendo 50 mL de melaço de soja em concentração de 250 g/L, durante 120 horas (5 dias) coletando amostras a cada 3 horas nas primeiras 12 horas, a cada 6 horas até o final das 120 horas.

Para determinar as faixas de operação e limites do Planejamento Composto Central, foram realizados testes preliminares variando-se a concentração de melaço de soja no meio, a temperatura de fermentação e o pH inicial do meio. As diferentes condições testadas foram:

- Concentração do melaço de soja no meio fermentativo variando de 100 a 350 g/L;
- Temperatura de operação de 25 e 30 °C;
- pH inicial do meio fermentativo variando de 2 a 9;

Todos os experimentos dos testes preliminares, foram realizados em triplicata e em incubadora rotativa a 130 rpm.

As condições utilizadas nestes testes preliminares foram definidos com base nos trabalhos encontrados na literatura (TOMMASO et al., 2010).

### **3.4. Metodologia Experimental para a Produção de Lipase**

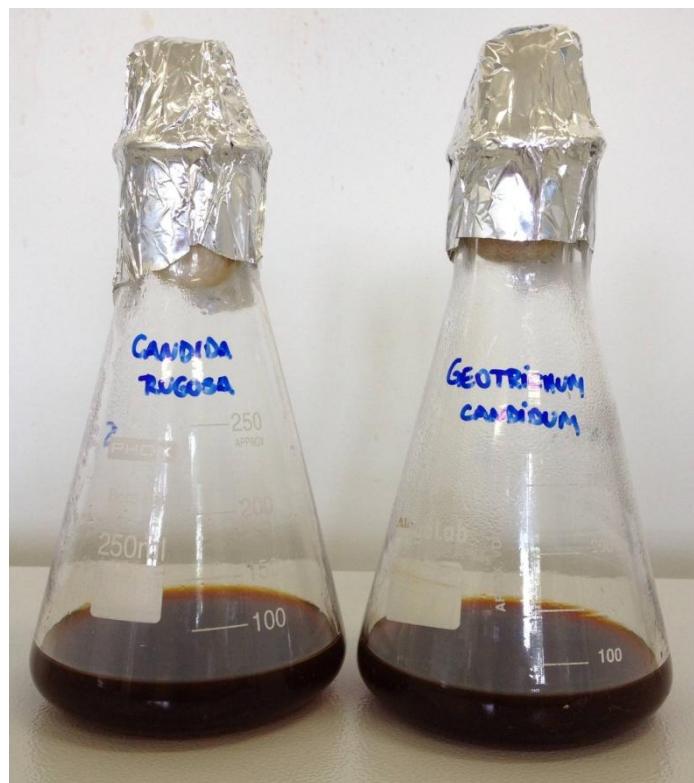
Os micro-organismos utilizados nos ensaios foram obtidos por meio de repiques da cultura estoque dos micro-organismos advindos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, e foram repicados a cada 15 dias em meio específico: Gelose Czaapeck para *Candida rugosa* e Gelose Sabourand para *Geotrichum candidum*.

Os ensaios experimentais foram realizados de acordo com o planejamento experimental utilizado.

Os experimentos foram conduzidos no sistema batelada em reatores de bancada com volume útil de 250 mL cada. Em cada um desses reatores, adicionou-se 50 mL de melaço de soja diluído e pH inicial foi ajustado em 3,5. Os reatores de bancada contendo o meio fermentativo, foram esterilizados em autoclave, por 20 minutos à 121 °C. Os micro-organismos foram inoculados separadamente, utilizando-se uma alça de platina. Após inoculados, os reatores de bancada foram colocados sob agitação em incubadora rotativa a 130 rpm e 27 °C durante 12 horas para *Candida rugosa* e 24 horas para *Geotrichum candidum*, tempos definidos pelos testes preliminares realizados.

Após o tempo decorrido, o caldo enzimático foi centrifugado, o sobrenadante foi analisado e o precipitado foi lavado por três vezes para realizar a análise de massa seca, afim de avaliar o crescimento celular de cada micro-organismo.

A Figura 3.2 mostra a foto dos reatores de bancada, contendo o meio fermentativo, esterilizados e inoculados e a Figura 3.3 mostra a unidade de trabalho utilizada nos experimentos, constituída por uma incubadora rotativa.



**Figura 3.1** – Reatores de bancada prontos para o processo de produção de lipase.



**Figura 3.2** – Incubadora rotativa, utilizada nos experimentos.

### 3.5. Planejamento Experimental para a Produção de Lipase

Para análise da interação entre as variáveis selecionadas e o estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas obtidas utiliza-se a técnica do planejamento experimental, com o qual se faz a otimização por análise da superfície de resposta.

Para se fazer a análise da superfície de resposta, foi necessário primeiramente programar ensaios por meio de um planejamento experimental, em que se selecionou um número fixo de níveis para cada uma das variáveis selecionadas. Desta forma foi possível executar experimentos com todas as possíveis combinações.

Para produção de lipase, foi realizado um Planejamento Composto Central (PCC) com dois níveis originais, utilizando-se o software *Statistica* 7.0, tendo-se  $2^3$  pontos fatoriais, 2 x 3 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos, para cada micro-organismo estudado.

O pH inicial do meio de fermentação foi determinado a partir dos testes preliminares que indicaram que, tanto a lipase produzida por *Candida rugosa* como por *Geotrichum candidum*, apresentaram uma maior atividade de lipase em pH inicial no valor de 3,5.

A faixa de temperatura de operação, para produção de lipase, para ambos os micro-organismos, foi atribuída com base em dados da literatura. Esse valor proposto foi de 30 °C.

A faixa de concentração de melaço de soja no meio fermentativo, variando de 32 a 368 g/L, foi atribuída pelos resultados obtidos nos testes preliminares.

O pH inicial do meio fermentativo variou de 2,66 a 4,34, a temperatura de operação, de 21,6 a 38,4 °C e a concentração de melaço de soja no meio fermentativo, variou de 32 a 368 g/L. Neste planejamento, foi utilizado um alfa de rotabilidade, afim de ampliar a faixa experimental, no valor de 1,68. Todos os níveis das variáveis estudadas foram adimensionalizados (codificados) pela utilização da Equação 3.1

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\left[ \frac{X_{+1} - X_{-1}}{2} \right]} \quad (3.1)$$

Sendo que,

$X_n$  = valor codificado da variável ( $n = 1,2, \dots$ )

$X$  = valor da variável a ser calculada;

$X_0$  = valor da variável no ponto central;

$X_{+1}$  = valor da variável no nível superior;

$X_{-1}$  = valor da variável no nível inferior.

As equações de codificação para o pH, a temperatura de operação (T) e a concentração de melaço de soja no meio (C) são mostradas nas Equações 3.2, 3.3 e 3.4, respectivamente.

$$X_1 = \frac{(pH - 3,5)}{0,5} \quad (3.2)$$

$$X_2 = \frac{(T - 30)}{5} \quad (3.3)$$

$$X_3 = \frac{(C - 200)}{100} \quad (3.4)$$

Na Tabela 3.1 podem ser vistos os valores utilizados no Planejamento Experimental para as três variáveis independentes analisadas nas suas formas codificadas e reais.

**Tabela 3.1** – Valores utilizados no planejamento experimental para as três variáveis independentes

	<b>-<math>\alpha</math></b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+<math>\alpha</math></b>
<b>pH inicial</b>	2,66	3,0	3,5	4,0	4,34
<b>T (°C)</b>	21,6	25	30	35	38,4
<b>C (g/L)</b>	32	100	200	300	368

C: concentração de melaço de soja)

A Tabela 3.2 mostra a matriz do Planejamento Composto Central com valores codificados e originais das variáveis em estudo, para *Candida rugosa* e para *Geotrichum candidum*. Os ensaios foram realizados de forma aleatória, a fim de evitar tendenciosidade dos resultados.

**Tabela 3.2** – Matriz do Planejamento Composto Central com valores codificados e originais das variáveis, para ambos os micro-organismos.

<b>Experimento</b>	<b>X<sub>1</sub> (pH)</b>	<b>X<sub>2</sub> (T) (°C)</b>	<b>X<sub>3</sub> (C) (g/L)</b>
1	-1 (3,0)	-1 (25)	-1 (100)
2	-1 (3,0)	-1 (25)	+1 (300)
3	-1 (3,0)	+1 (35)	-1 (100)
4	-1 (3,0)	+1 (35)	+1 (300)
5	+1 (4,0)	-1 (25)	-1 (100)
6	+1 (4,0)	-1 (25)	+1 (300)
7	+1 (4,0)	+1 (35)	-1 (100)
8	+1 (4,0)	+1 (35)	+1 (300)
9	- $\alpha$ (2,66)	0 (30)	0 (200)
10	+ $\alpha$ (4,34)	0 (30)	0 (200)
11	0 (3,5)	- $\alpha$ (21,6)	0 (200)
12	0 (3,5)	+ $\alpha$ (38,4)	0 (200)
13	0 (3,5)	0 (30)	- $\alpha$ (32)
14	0 (3,5)	0 (30)	+ $\alpha$ (368)
15 (C)	0 (3,5)	0 (30)	0 (200)
16 (C)	0 (3,5)	0 (30)	0 (200)
17 (C)	0 (3,5)	0 (30)	0 (200)

C: concentração de melaço de soja

### 3.6. Metodologia Analítica

Após o tempo de fermentação estipulado para cada micro-organismo (12 horas para *Candida rugosa*; 24 horas para *Geotrichum candidum*), as amostras do caldo enzimático foram centrifugados à 12.500 rpm (9800 g) por 15 minutos. O sobrenadante foi separado para ser analisado e purificado, e o precipitado foi lavado com água destilada e centrifugado, repetindo-se este procedimento por 3 vezes, posteriormente foi colocado em placa de Petri e levado à estufa à 108 °C até peso constante, para avaliação de massa seca.

Para as amostras de sobrenadante, avaliou-se a atividade de lipase e a atividade de protease. Após o método de purificação, analisou-se além da atividade de lipase, a concentração de proteína.

#### 3.6.1. Atividade de Lipase

A atividade enzimática da lipase foi determinada por titulação com NaOH 0,05N, medindo a concentração dos ácidos graxos livres. A reação foi realizada em erlenmeyers de 125 mL com 5 mL de emulsão composta de 25% azeite de oliva e 75% goma arábica (7%

p/v) como substrato, 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7 e 1 mL do caldo fermentado centrifugado. Agitou-se a solução por 30 minutos a temperatura determinada para cada micro-organismo (45°C para *Candida rugosa*; 37°C para *Geotrichum candidum*) com ajuda de um agitador magnético. A reação foi interrompida adicionando-se 10 mL de solução acetona e etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados durante a reação foram titulados na presença do indicador fenolftaleína. A atividade foi expressa em unidades de lipase (U), correspondente à 1 µmol de ácido graxo liberado por minuto nas condições especificadas (TOMMASO et al., 2010).

### **3.6.2. Atividade de Protease**

A atividade enzimática da protease foi determinada reagindo 0,5 mL de azocaseína 1% e 0,3 mL de caldo fermentado centrifugado. Após 1 hora de incubação a 37°C em um banho termostático, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente. Logo após, adicionou-se 2,4 mL de ácido tricloacético 10% e centrifugou-se a mistura a 3000 rpm por 15 minutos. Adicionou-se 2,4 mL de NaOH 1N em 1,6 mL do sobrenadante resultante, e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 440 nm. A atividade foi expressa em unidade de protease (U), definida como a quantidade de enzima necessária para obter uma diferença de absorbância de 1 U/(mL.min) de caldo enzimático (TOMMASO et al., 2010).

### **3.6.3. Crescimento Celular**

O crescimento celular foi quantificado utilizando o valor da massa seca. Após centrifugar 50 mL do meio fermentado, lavou-se o centrifugado por 3 vezes com água destilada e, em placa de Petri, previamente tarada, colocou-se para secar em estufa à 90°C por 48 horas. Após o tempo decorrido colocou-se as placas com a massa seca em dessecador contendo sílica, por 2 horas, pesando as posteriormente.

A massa seca foi expressa em gramas por litro.

### **3.6.4. Concentração de Proteínas**

A determinação da concentração de proteína foi realizada pelo Método de Lowry (1951) descrito no Apêndice A.

### **3.7. Testes Preliminares para o Sistema Aquoso Bifásico**

A curva binodal, foi determinada pelo método do ponto de nuvem descrito por Albertsson (1986). Vários sistemas aquosos bifásicos foram preparados com uma mistura de álcool e uma solução de sal, em tubos separados. A mistura ficou inicialmente turva, indicando que duas fases eventualmente se formariam. Adicionou-se água destilada, gota a gota, seguida por agitação suave, até que a turbidez desaparecesse. Os pontos de transição de fase foram aproximados pela medição do peso total da água destilada adicionada ao sistema. As concentrações dos componentes de formação da fase, encontrados no sistema final, foram calculadas. A curva binodal foi então plotada em diferentes concentrações de álcool e sal.

### **3.8. Metodologia Experimental para a Purificação da Lipase (Sistema Aquoso Bifásico)**

Os sistemas de fase foram preparados em tubos de centrífuga graduados de 15 mL, uma quantidade adequada de álcool foi pesada juntamente com solução reserva de sal (40% p/p) e a amostra do caldo enzimático (20% p/p). A água destilada foi então adicionada a cada sistema, gota a gota, para obter uma massa final de 10 g. Após mistura cuidadosa, por agitação suave, cada sistema foi centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos para induzir a separação de fases e deixado em repouso por 12 horas. Os volumes das fases, superior e inferior, foram medidos e separados para que cada uma das fases fosse analisada.

### **3.9. Planejamento Experimental para a Purificação da Lipase (Sistema Aquoso Bifásico)**

Para purificação da lipase utilizando Sistema Aquoso Bifásico, foi realizado um Planejamento Composto Central (PCC) com dois níveis originais, utilizando-se o software *Statistica* 7.0, tendo-se  $2^2$  pontos fatoriais, 2 x 2 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos, para cada micro-organismo.

As concentrações dos componentes do sistema aquoso bifásico (álcool e solução de sal-básico) foram determinadas a partir dos testes preliminares que indicaram que, ambos os micro-organismos estudados neste trabalho, obtiveram maior seletividade e fator de

purificação no sistema de proporção entre as concentrações de álcool e solução de sal-básico em 20/20 (% p/p).

A concentração de álcool (%p/p) e de solução de sal-básico variou de 14,4 a 25,6. Neste planejamento, assim como o feito para produção de lipase, foi utilizado um alfa de rotabilidade, afim de ampliar a faixa experimental, no valor de 1,41. Todos os níveis das variáveis estudadas foram adimensionalizados (codificados) pela utilização da Equação 3.5

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\left[ \frac{X_{+1} - X_{-1}}{2} \right]} \quad (3.5)$$

Sendo que,

$X_n$  = valor codificado da variável ( $n = 1,2,\dots$ )

$X$  = valor da variável a ser calculada;

$X_0$  = valor da variável no ponto central;

$X_{+1}$  = valor da variável no nível superior;

$X_{-1}$  = valor da variável no nível inferior

As equações de codificação para a concentração de álcool ( $C_A$ ) e a concentração se solução de sal-básico ( $C_S$ ) são mostradas, respectivamente, nas Equações 3.6 e 3.7.

$$X_4 = \frac{(C_A - 20)}{4} \quad (3.6)$$

$$X_5 = \frac{(C_S - 20)}{4} \quad (3.7)$$

Na Tabela 3.3 podem ser vistos os valores utilizados no Planejamento Experimental para as duas variáveis independentes analisadas.

**Tabela 3.3** – Valores utilizados no planejamento para as duas variáveis independentes

	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
$C_A$ (% p/p)	14,4	16	20	24	25,6
$C_S$ (% p/p)	14,4	16	20	24	25,6

$C_A$ : Concentração de álcool;  $C_S$ : concentração de sal

A Tabela 3.4 mostra a matriz do Planejamento Composto Central (PCC) com valores codificados e originais das variáveis em estudo, para *Candida rugosa* e para *Geotrichum candidum*. Assim como no PCC anterior, os ensaios foram realizados de forma aleatória, a fim de evitar tendenciosidade nos resultados.

**Tabela 3.4** – Matriz do Planejamento Composto Central com valores codificados e originais das variáveis, para ambos os micro-organismos.

Experimento	$X_4$ (Conc. Álcool) (%p/p)	$X_5$ (Conc. Sal) (%p/p)
1	-1 (16)	-1 (16)
2	-1 (16)	+1 (24)
3	+1 (24)	-1 (16)
4	+1 (24)	+1 (24)
5	$-\alpha$ (14,4)	0 (20)
6	$+\alpha$ (25,6)	0 (20)
7	0 (20)	$-\alpha$ (14,4)
8	0 (20)	$+\alpha$ (25,6)
9 (C)	0 (20)	0 (20)
10 (C)	0 (20)	0 (20)
11 (C)	0 (20)	0 (20)

Realizado o planejamento experimental e análise dos resultados, para *Candida rugosa* e para *Geotrichum candidum*, efetuou-se experimentos nos melhores pontos obtidos pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno e por uma rotina implementada no software *Maple 13*, para verificação dos pontos ótimos, com o objetivo de testar a reproduutibilidade dos modelos obtidos.

### 3.10. Cálculos das Respostas do Sistema Aquoso Bifásico

#### 3.10.1. Seletividade

A seletividade ( $S$ ) foi definida como a razão entre o coeficiente de partição da lipase ( $K_e$ ) e o coeficiente de partição da proteína ( $K_p$ ), como mostra a Equação 3.8.

$$S = \frac{K_E}{K_P} = \frac{A_T}{A_B} \cdot \frac{P_B}{P_T} \quad (3.8)$$

sendo  $K_E$  e  $K_P$  as proporções de lipase e concentrações de proteína encontrados em cada fase (superior e inferior), respectivamente.  $A_T$  e  $A_B$  as atividades de lipase (em U/mL) da fase superior e da fase inferior, respectivamente.  $P_T$  e  $P_B$  as concentrações total de proteína (em mg/mL) observadas nas fases superior e inferior, respectivamente.

### 3.10.2. Fator de Purificação

O fator de purificação ( $P_{FT}$ ) foi calculado pela razão entre a atividade de lipase na fase superior e a atividade de lipase do caldo enzimático inicial, como mostrado na Equação 3.9.

$$P_{FT} = \frac{AL_s}{AL_0} \quad (3.9)$$

Em que:

$AL_s$  = atividade de lipase da fase superior (U/mL);

$AL_0$  = atividade de lipase do caldo enzimático inicial (U/mL).

### 3.10.3. Rendimento da Enzima Recuperada

O rendimento da lipase recuperada na fase superior e inferior foi determinado pelas equações 3.10 e 3.11, respectivamente.

$$Y_T (\%) = \frac{100}{1 + \left( \frac{1}{V_R \cdot K_E} \right)} \quad (3.10)$$

$$Y_B (\%) = \frac{100}{1 + \left( \frac{1}{V_R \cdot K_E} \right)} \quad (3.11)$$

sendo  $Y_T$  o rendimento da enzima recuperada da fase superior,  $Y_B$  o rendimento da enzima recuperada da fase inferior e  $V_R$  a razão do volume entre as fases superior e inferior.

## CAPÍTULO 4

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Testes Preliminares para a Produção de Lipase

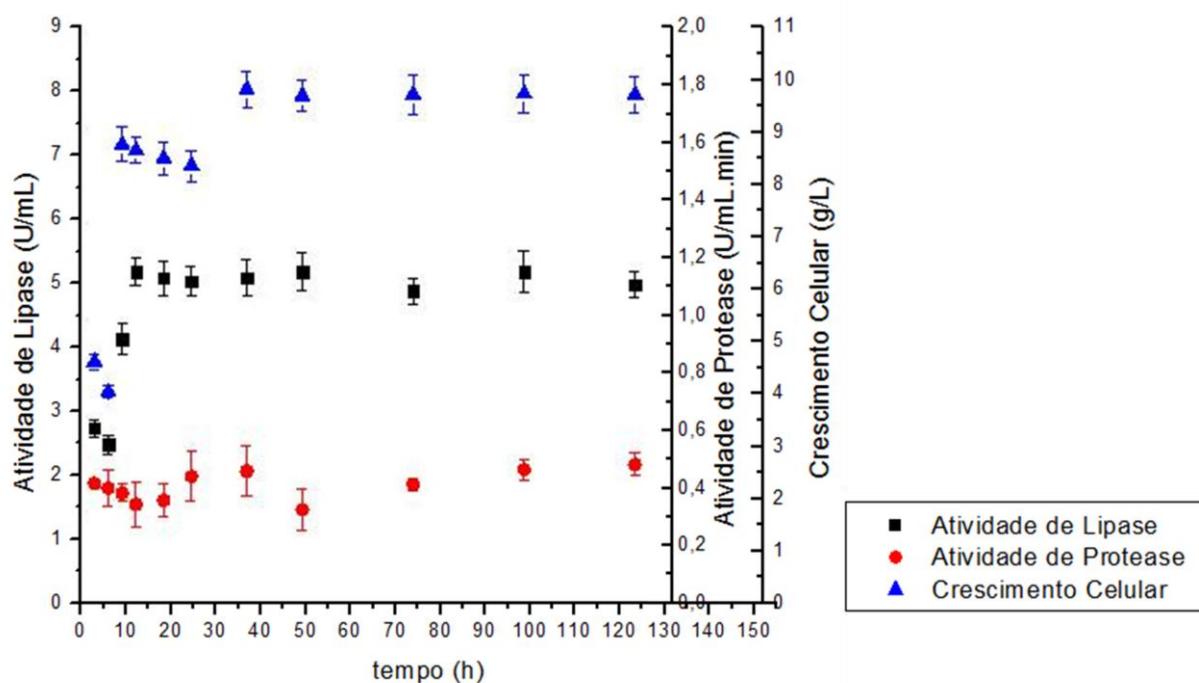
Os testes preliminares foram realizados para se confirmar os métodos analíticos utilizados, eliminar possíveis causas de erros sistemáticos e definir um tempo ideal de análise das respostas para as fermentações na produção de lipase.

Durante a fase de testes preliminares avaliou-se, além do tempo de fermentação, a influência do pH, da temperatura e da concentração de melaço de soja no meio fermentativo. Foram realizadas fermentações em reatores de bancada, variando-se pH e a concentração do melaço de soja no meio fermentativo.

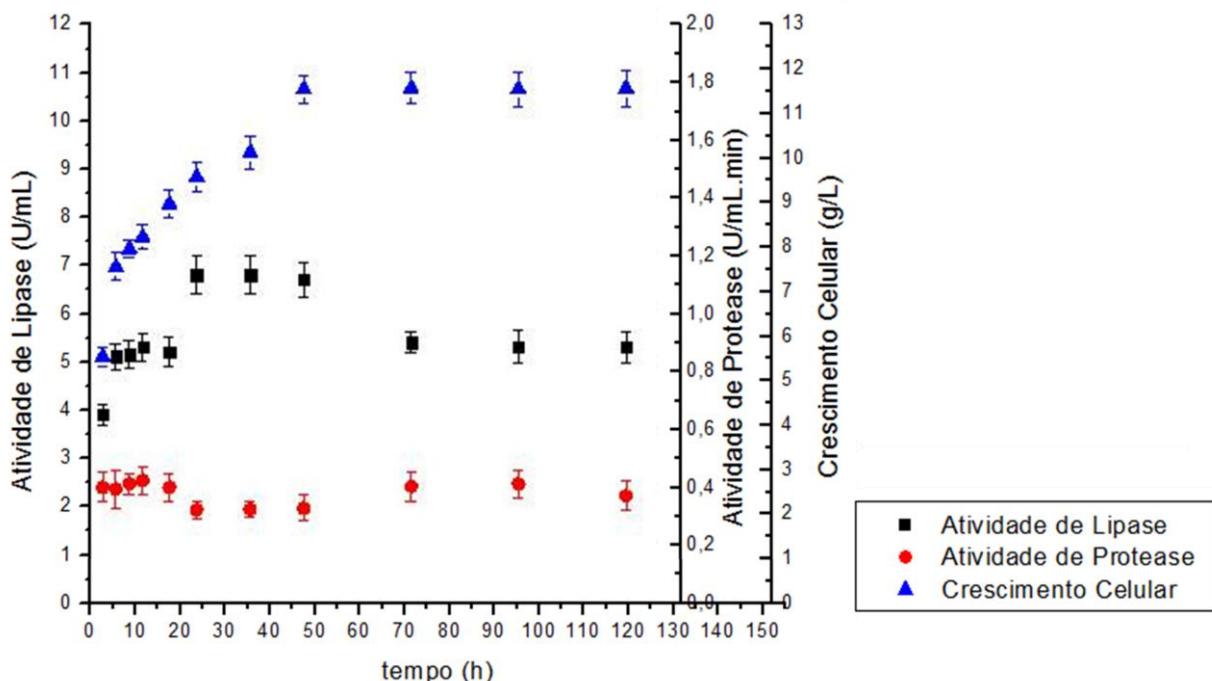
Os resultados mostrados na Figura 4.1 indicam que a atividade de lipase, no meio fermentado por *Candida rugosa*, aumenta até o tempo de 12 horas de fermentação, alcançando o valor de 5,25 U/mL, mantendo-se praticamente constante até 48 horas de fermentação, quando essa atividade de lipase começa a diminuir. Analisando os resultados da atividade de protease podemos concluir que seu aumento, após as 48 horas de fermentação, influencia na diminuição da atividade de lipase. Os resultados de massa seca mostraram que houve crescimento celular nas primeiras 36 horas de fermentação, quando se alcançou um valor de 9,9 g/L, a partir daí se manteve praticamente constante.

Na Figura 4.2, observa-se que a atividade de lipase, no meio fermentado por *Geotrichum candidum*, aumenta até o tempo de 24 horas de fermentação, chegando à um valor de 6,25 U/mL, permanecendo praticamente estável até 48 horas, quando começa a decrescer. Analisando os resultados da atividade de protease pode-se observar que seu aumento, após as 48 horas de fermentação, influencia na diminuição da atividade de lipase. Os resultados de massa seca mostraram que houve crescimento celular nas primeiras 48 horas de fermentação, quando se alcançou um valor de 11,5 g/L, a partir daí se manteve praticamente constante.

Para *Candida rugosa* foi escolhido o tempo de 12 horas e para *Geotrichum candidum* foi escolhido o tempo de 24 horas, ambos baseados no resultado de atividade de lipase máxima alcançada pelos micro-organismos.

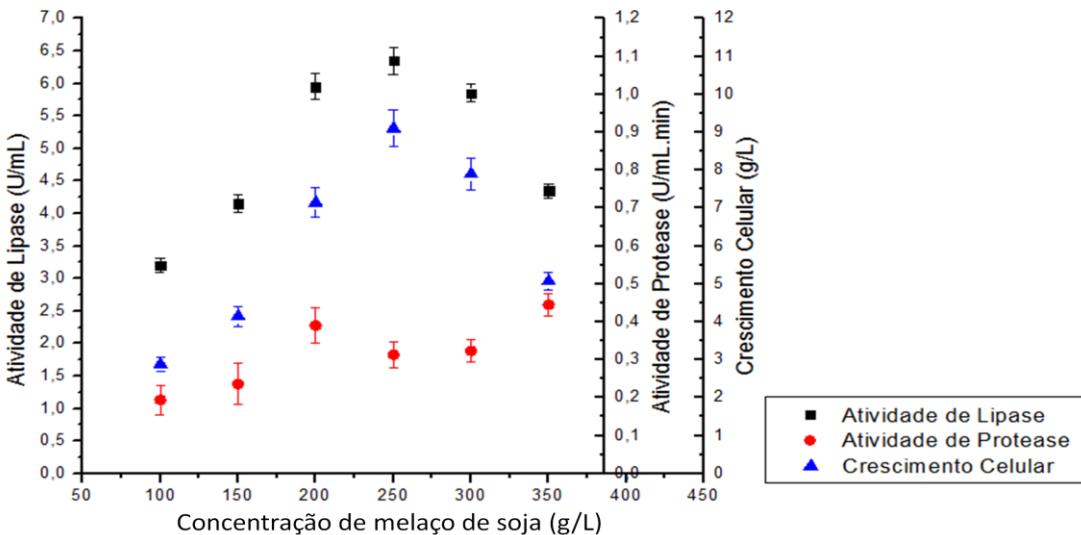


**Figura 4.1** – Resultados de atividade de lipase, atividade de protease e de crescimento celular obtidos nos testes preliminares para a fermentação com melão de soja para *Candida rugosa*.



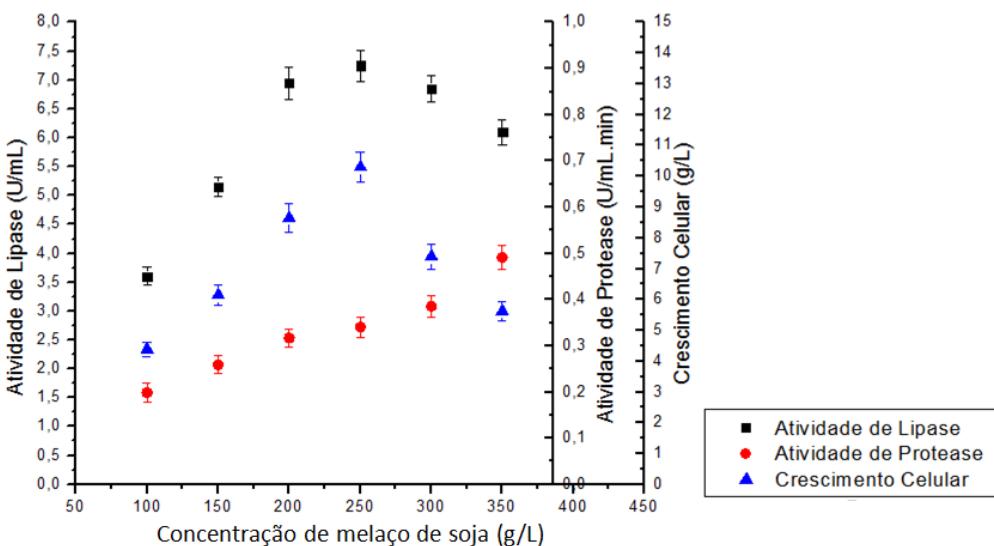
**Figura 4.2** – Resultados de atividade de lipase, atividade de protease e de crescimento celular obtidos nos testes preliminares para a fermentação com melão de soja para *Geotrichum candidum*.

Analizando a Figura 4.3, observa-se que, para *Candida rugosa*, obteve-se a melhor atividade de lipase, 6,35 U/mL, em um meio de fermentação contendo 250 g/L de melaço de soja.



**Figura 4.3** – Resultados de atividade de lipase, atividade de protease e de crescimento celular obtidos nos testes preliminares variando a concentração de melaço de soja para *Candida rugosa*.

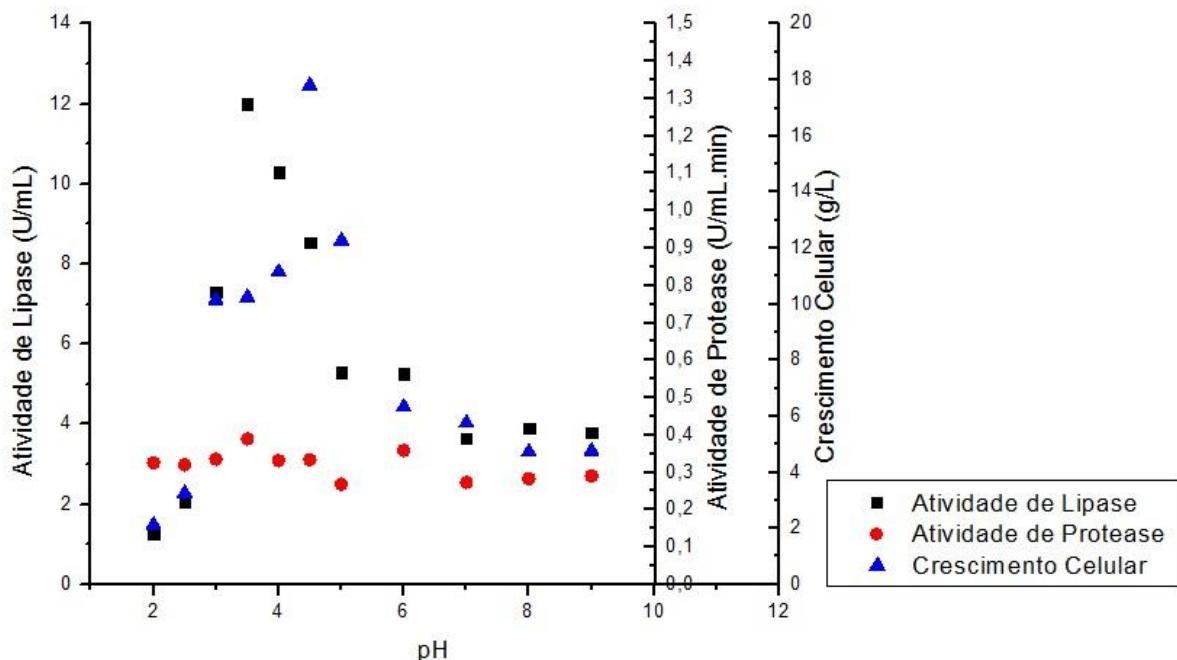
Para os testes realizados com *Geotrichum candidum*, variando-se a concentração de melaço de soja no meio de fermentação, obteve-se uma melhor atividade de lipase de 7,25 U/mL, também para a concentração de 250 g/L de melaço de soja, como mostra na Figura 4.4.



**Figura 4.4** – Resultados de atividade de lipase, atividade de protease e de crescimento celular obtidos nos testes preliminares variando a concentração de melaço de soja para *Geotrichum candidum*.

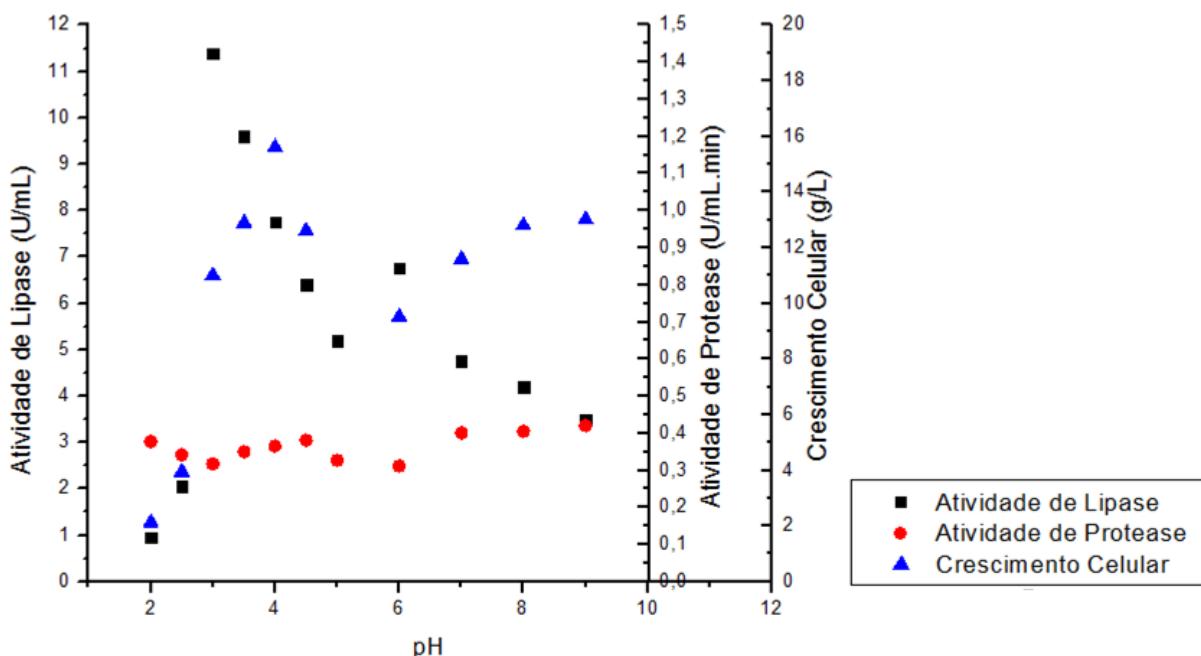
Para os testes preliminares realizados, variando-se o pH inicial do meio fermentativo, pode-se observar que para ambos os micro-organismos obteve-se uma maior atividade de lipase no caldo enzimático resultante do meio com pH inicial de 3,5.

Na Figura 4.5 pode-se observar que, para *Candida rugosa*, o maior crescimento celular se deu no meio fermentativo com pH inicial em torno de 4,5, e que a atividade de protease se manteve-se entre 0,2 e 0,4 para os valores de pH testados.



**Figura 4.5** – Resultados de atividade de lipase, atividade de protease e de crescimento celular obtidos nos testes preliminares variando o pH inicial do meio contendo melaço de soja para *Candida rugosa*.

O mesmo comportamento pode ser observado pelo caldo enzimático obtido da fermentação pelo *Geotrichum candidum* em que obteve um maior crescimento celular em pH 4,5 e a atividade de protease ficou na faixa de 0,3 a 0,45, como mostra a Figura 4.6.



**Figura 4.6** – Resultados de atividade de lipase, atividade de protease e de crescimento celular obtidos nos testes preliminares variando o pH inicial do meio contendo melaço de soja para *Geotrichum candidum*.

A partir dos resultados obtidos nos testes preliminares, realizou-se o Planejamento Composto Central a fim de se obter um ponto ótimo para a produção de lipase em melaço de soja por *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*.

#### 4.2. Planejamento Experimental para a Produção de Lipase

Neste planejamento experimental estudou-se a atividade de lipase do caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*. A atividade de lipase é avaliada em relação ao pH inicial do meio fermentativo, concentração inicial de substrato (melaço de soja), e pela temperatura de fermentação. Estas três variáveis independentes que afetam fortemente o desempenho na produção de lipase foram avaliadas nas faixas: pH inicial do meio (2,66 a 4,34), a concentração de melaço de soja no meio fermentativo (32 a 368 g/L), e temperatura de fermentação (21,6 a 38,4°C), durante todo o processo de produção da lipase, a temperatura de fermentação foi controlada, tanto para *Candida rugosa* quanto para *Geotrichum candidum*. Os experimentos realizados com *Candida rugosa* foram conduzidos por 12 horas e os realizados com *Geotrichum candidum*, foram conduzidos por 24 horas. A

partir desses resultados experimentais pôde-se traçar o perfil dos parâmetros de operação para produção de lipase em melaço de soja.

A Tabela 4.1 mostra os valores codificados e originais das variáveis de estudo e as respostas atividade de lipase para *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*.

Observa-se na Tabela 4.1 que, para o caldo enzimático resultante da fermentação por *Candida rugosa* a atividade de lipase variou de 1,25 U/mL (experimentos 1 e 9) a 12,15 U/mL (experimento 15) e, para o caldo enzimático resultante da fermentação por *Geotrichum candidum*, a atividade de lipase esteve entre 0,95 U/mL (experimento 9) e 11,60 U/mL (experimento 15). Além disso verifica-se que os pontos centrais apresentaram uma variação pequena para todas as respostas indicando uma boa repetibilidade do processo.

Pode-se observar que, para ambos os micro-organismos, a maior atividade de lipase ocorreu nos pontos centrais do planejamento experimental, e que o menor valor dessa atividade ocorreu para o menor valor do pH inicial no meio fermentativo.

**Tabela 4.1** – Variáveis utilizadas no PCC e a resposta de atividade de lipase para *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*

Experimento	$X_1$ (pH)	$X_2$ (T) (°C)	$X_3$ (C) (g/L)	Atividade de Lipase (U/mL)	
				<i>Candida rugosa</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
1	-1 (3,0)	-1 (25)	-1 (100)	1,25	2,15
2	-1 (3,0)	-1 (25)	+1 (300)	1,90	1,95
3	-1 (3,0)	+1 (35)	-1 (100)	2,25	2,60
4	-1 (3,0)	+1 (35)	+1 (300)	1,95	3,70
5	+1 (4,0)	-1 (25)	-1 (100)	6,75	6,15
6	+1 (4,0)	-1 (25)	+1 (300)	11,40	10,80
7	+1 (4,0)	+1 (35)	-1 (100)	6,05	5,45
8	+1 (4,0)	+1 (35)	+1 (300)	9,70	11,55
9	- $\alpha$ (2,66)	0 (30)	0 (200)	1,25	0,95
10	+ $\alpha$ (4,34)	0 (30)	0 (200)	8,50	8,11
11	0 (3,5)	- $\alpha$ (21,6)	0 (200)	9,15	9,65
12	0 (3,5)	+ $\alpha$ (38,4)	0 (200)	9,60	5,00
13	0 (3,5)	0 (30)	- $\alpha$ (32)	4,65	3,20
14	0 (3,5)	0 (30)	+ $\alpha$ (368)	7,75	9,15
15 (C)	0 (3,5)	0 (30)	0 (200)	12,15	11,50
16 (C)	0 (3,5)	0 (30)	0 (200)	11,90	11,35
17 (C)	0 (3,5)	0 (30)	0 (200)	12,00	11,60

Um nível de significância de 95% foi considerado, ou seja, foram considerados significativos os parâmetros em que  $p < 0,05$ .

Com os resultados apresentados na Tabela 4.3, foi possível analisar estatisticamente o comportamento de cada resposta. Para isto, determinaram-se os coeficientes de regressão após a realização da regressão múltipla no programa *Statistica 7.0*.

#### **4.2.1. Atividade de Lipase do Caldo Enzimático Fermentado por *Candida rugosa***

A Tabela 4.2 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com parâmetros significativos e não significativos para a resposta de atividade de lipase do caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa*, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos.

A partir desta análise foi obtida a Equação 4.1:

$$AL_{Cr}(U/mL) = 12,10 + 2,84.X_1 - 2,82.X_1^2 - 0,04.X_2 - 1,23.X_2^2 + 1,02.X_3 - 2,36.X_3^2 - 0,43.X_1.X_2 + 0,99.X_1.X_3 - 0,24.X_2.X_3 \quad (4.1)$$

**Tabela 4.2 – Regressão múltipla para a resposta atividade de lipase de *Candida rugosa***

Variáveis e interações	Coeficiente de Regressão	Desvio	t(7)	p
Termo Independente	12,10335	0,711421	17,01293	0,000001
(X <sub>1</sub> ) pH (L)	2,83689	0,668179	8,49141	0,000062
pH (Q)	-2,82355	0,735428	-7,67867	0,000118
(X <sub>2</sub> ) Temperatura (L)	-0,04344	0,668179	-0,13001	0,900214
Temperatura (Q)	-1,23256	0,735428	-3,35196	0,012218
(X <sub>3</sub> ) Concentração (L)	1,01514	0,668179	3,03852	0,018886
Concentração (Q)	-2,35510	0,735428	-6,40469	0,000366
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	-0,43125	0,873017	-0,98795	0,356087
X <sub>1</sub> .X <sub>3</sub>	0,99375	0,873017	2,27659	0,056922
X <sub>2</sub> .X <sub>3</sub>	-0,24375	0,873017	-0,55841	0,593969
$R^2=0,96$				

Considerando os níveis de significância (p) menores que 5% para a resposta atividade de lipase, os parâmetros não significativos que puderam ser desprezados, foram: as interações entre as variáveis X<sub>1</sub>.X<sub>2</sub> e X<sub>2</sub>.X<sub>3</sub>, e o termo quadrático da temperatura.

A Equação 4.2 representa o modelo com as variáveis significativas codificadas para a resposta atividade de lipase.

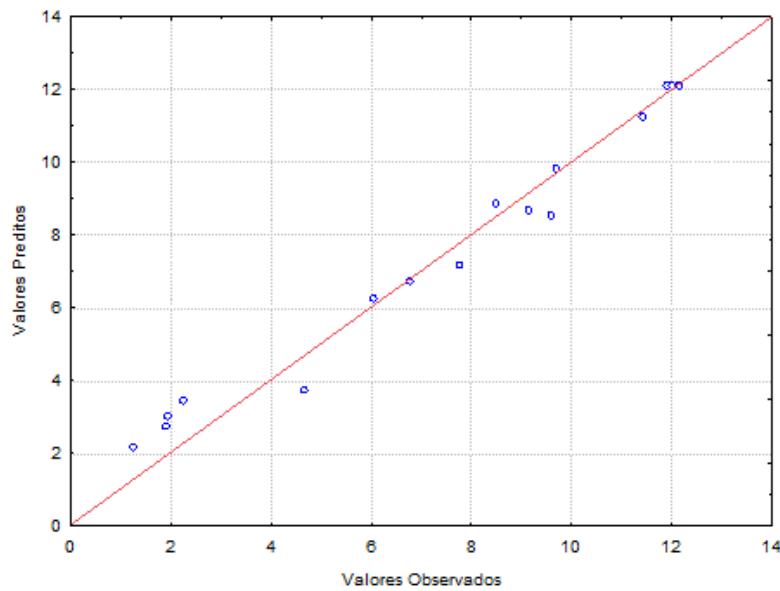
$$AL_{Cr}(\%) = 12,10 + 2,84 \cdot X_1 - 2,82 \cdot X_1^2 - 1,23 \cdot X_2^2 + 1,02 \cdot X_3 - 2,35 \cdot X_3^2 + 0,99 \cdot X_1 \cdot X_3 \quad (4.2)$$

Analizando-se a Equação 4.2 pode-se verificar que a temperatura ( $X_2$ ) não exerceu influência significativa, sobre a atividade de lipase, de forma linear ou por interações com outras variáveis.

Pela análise dos coeficientes das variáveis isoladas na Equação 4.2, pode-se observar que o pH ( $X_1$ ) contribui consideravelmente para o aumento da resposta atividade de lipase, desde que assuma valores codificados superiores ao nível central (3,5). Um aumento na concentração de melaço de soja no meio fermentativo ( $X_3$ ) também contribui para o aumento dessa atividade.

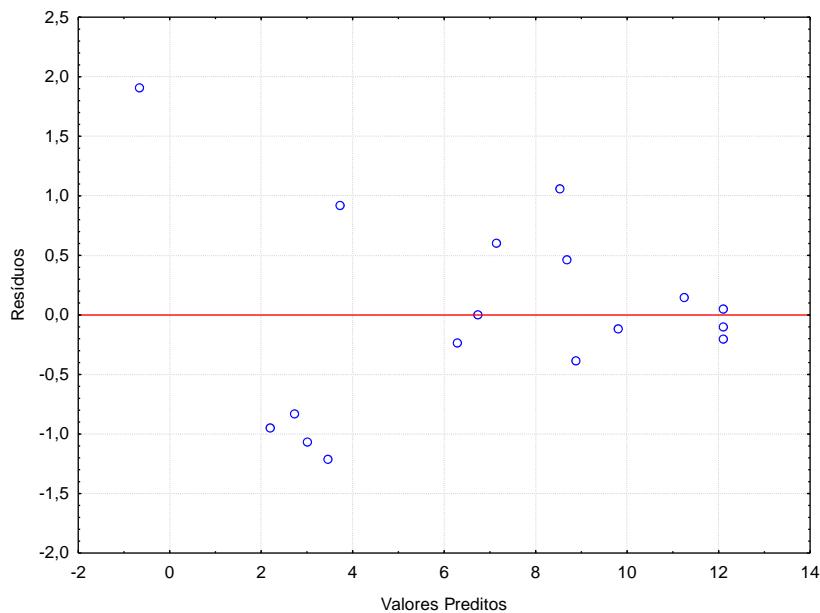
O sinal positivo dos coeficientes  $X_1$  e  $X_3$  indicou que maiores valores do pH inicial e da concentração de melaço de soja no meio contribuem para um aumento da atividade lipolítica na produção de lipase por *Candida rugosa*. A Tabela 4.3 confirma a interpretação dada ao modelo, deixando evidente que valores de pH inicial ( $X_1$ ) e de concentrações de melaço de soja ( $X_3$ ) próximos aos dos pontos centrais, produzem maiores atividade de lipase.

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtido após o ajuste foi de 0,95, indicando que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 95% da variabilidade dos dados. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.7



**Figura 4.7** – Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para a atividade de lipase de *Candida rugosa*

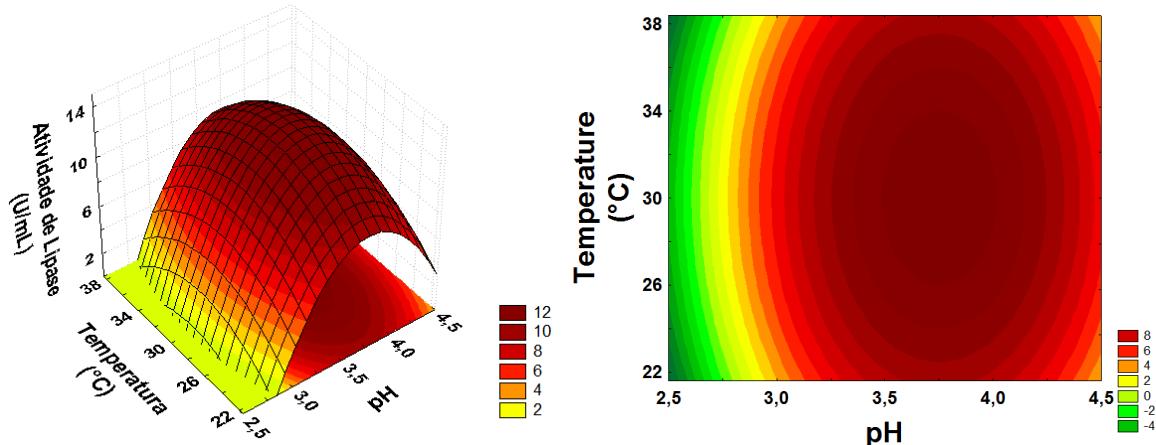
Pela Figura 4.8 pode-se observar que os erros de ajustamento se mostram independentes e normalmente distribuídos em torno da reta, o que indica normalidade para a resposta atividade de lipase.



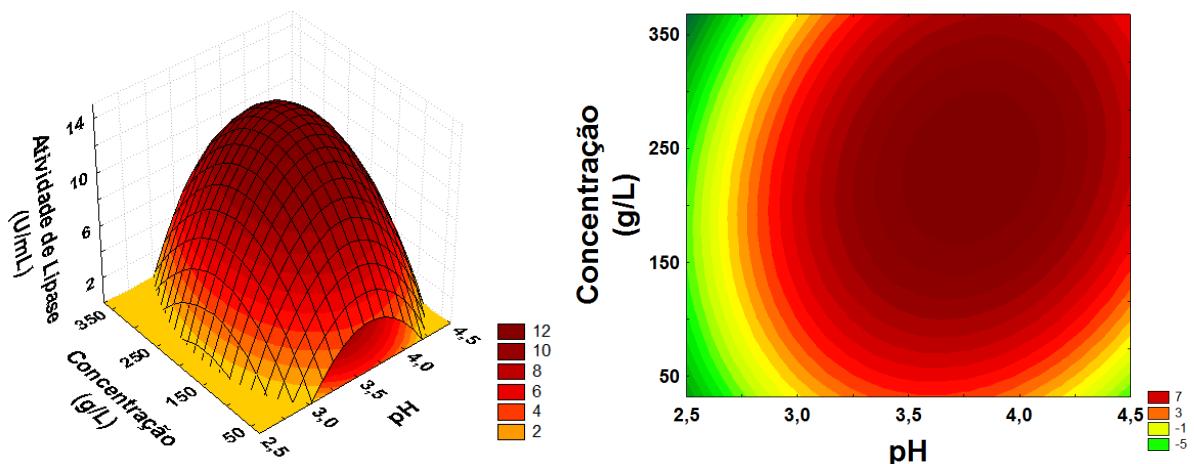
**Figura 4.8** – Distribuição dos resíduos para a resposta atividade de lipase de *Candida rugosa*

Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir regiões de interesse. A Figura 4.9 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de  $X_1$  e  $X_2$  para a atividade de lipase. Por se tratar de um planejamento que visa otimizar três variáveis de processo, elas serão apresentadas graficamente duas a duas junto à

resposta avaliada. Sendo assim, a Figura 4.10 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de  $X_1$  e  $X_3$ , e a Figura 4.11 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de  $X_2$  e  $X_3$ .



**Figura 4.9** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta atividade de lipase (*Candida rugosa*) em função do pH e da temperatura de fermentação

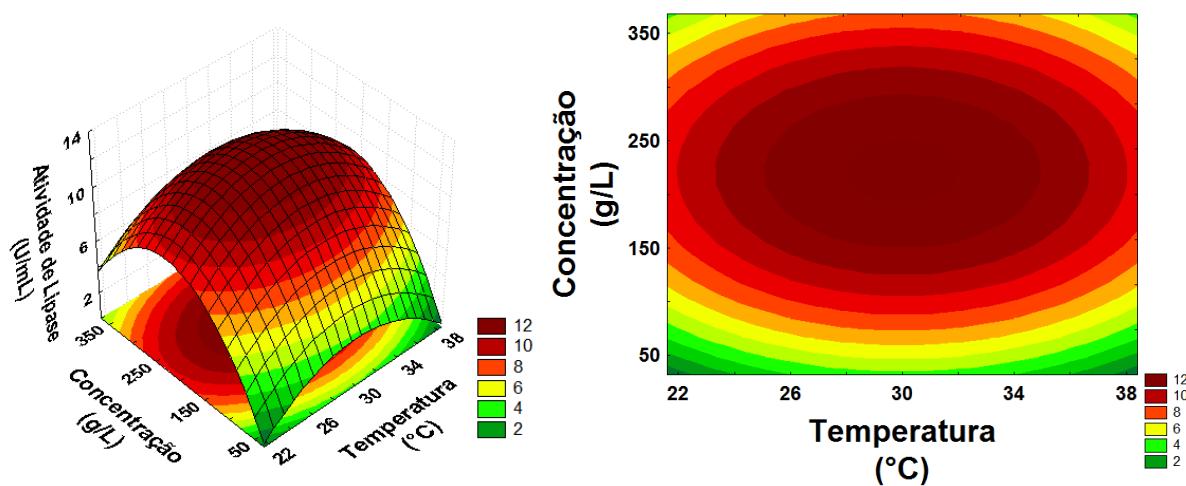


**Figura 4.10** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta atividade de lipase (*Candida rugosa*) em função do pH e da concentração de melaço de soja no meio

Analizando as curvas de contorno das Figuras 4.9 e 4.10 definiu-se a faixa de pH inicial do meio de fermentação que maximiza a atividade de lipase.

A curva de contorno que representa o efeito do pH inicial do meio de fermentação em sinergismo com a temperatura de operação (Figura 4.9) indica uma faixa aproximada de 3,5 a 4,0 para a maximização da resposta em questão. O efeito combinado do pH inicial e da concentração de melaço de soja no meio (Figura 4.10) indica uma faixa também de 3,5 a 4,0. Portanto, esta é a faixa que satisfaz ambos os efeitos combinados, ou seja, pode-se afirmar que para maximização da atividade lipolítica na produção de lipase em melaço de soja por

*Candida rugosa*, dentro da região experimental trabalhada, o pH inicial do meio deve estar entre 3,5 e 4,0.



**Figura 4.11** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta atividade de lipase (*Candida rugosa*) em função da temperatura de fermentação e da concentração de melaço de soja no meio.

Da mesma forma que para o pH inicial, a partir das curvas de contorno das Figuras 4.9 e 4.11, definiu-se a faixa de temperatura de operação que maximiza a atividade lipolítica na produção de lipase por *Candida rugosa* na região experimental trabalhada. A faixa aproximada de temperatura correspondente à máxima atividade de lipase está entre 26 e 33°C.

Para a definição da concentração de melaço de soja no meio fermentativo que maximiza a atividade lipolítica na produção de lipase por *Candida rugosa* foi realizada a análise das curvas de contorno das Figuras 4.10 e 4.11. De acordo com esta análise, visando uma maior atividade de lipase é interessante que a concentração de melaço de soja no meio esteja entre 180 e 260 g/L.

Com o objetivo de encontrar o ponto estacionário para a atividade de lipase, ou seja, o ponto correspondente à maximização da resposta atividade de lipase dentro da região de otimização, realizou-se uma análise canônica utilizando o modelo completo representado pelos coeficientes de regressão mostrados na Tabela 4.4. Utilizou-se um algoritmo implementado no software *Maple 13* e definiram-se as condições que maximizaram a resposta atividade de lipase, que foram: pH inicial do meio 3,8, temperatura de fermentação 29,2°C e concentração de melaço de soja no meio de 234,5 g/L. Tal resultado mostra-se em concordância à análise anterior já que todas as variáveis determinadas se encontram dentro da faixa definida.

A partir da Equação 4.2, obteve-se uma atividade de lipase de 13,03 U/mL quando da substituição do ponto ótimo.

Benjamin e Pandey (1997) utilizaram *Candida rugosa* imobilizada para produção de lipases em reator de leito empacotado e obtiveram 12,55 U/mL com células imobilizadas em alginato de cálcio.

Segundo Lakshmi et al. (1999), que estudou a produção de lipase por *Candida rugosa* em meio contendo óleos vegetais, obtiveram atividade lipolítica de 4,5 U/mL.

Dalmau et al. (2000), estudaram os efeitos de diferentes fontes de carbono na produção de lipase por *Candida rugosa* em fermentação submersa, utilizando meio contendo 2g/L de Tween 80 em pH 6,2 e temperatura 30°C e obtiveram uma atividade de 0,4 U/mL.

Moraes et al. (2007), produziram lipase de *Candida rugosa* utilizando soro de queijo, obtiveram uma atividade de lipase média de 15,4 U/mL.

Tommaso et al. (2010), estudaram os efeitos da proteína do queijo no meio de fermentação para produção de lipase por *Candida rugosa*, após 5 dias (120 horas) de fermentação e obtiveram uma atividade de lipase média de 20,2 U/mL.

Comparando-se os valores de atividade lipolítica da lipase produzida por *Candida rugosa*, obtidos nos experimentos e nos trabalhos citados, nota-se que no presente trabalho foram obtidos resultados com valores próximos aos encontrados na literatura.

#### **4.2.2. Atividade de Lipase do Caldo Enzimático Fermentado por *Geotrichum candidum***

Os coeficientes de regressão das variáveis e interações com parâmetros significativos e não significativos para a resposta de atividade de lipase do caldo enzimático fermentado por *Geotrichum candidum*, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos são mostrados na Tabela 4.3.

A partir desta análise foi obtida a Equação 4.3:

$$\text{AL}_{\text{Gc}}(\text{U/mL}) = 11,49 + 2,60 \cdot X_1 - 2,49 \cdot X_1^2 - 0,41 \cdot X_2 - 1,50 \cdot X_2^2 + 1,59 \cdot X_3 - 1,91 \cdot X_3^2 - 0,27 \cdot X_1 \cdot X_2 + 1,23 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,34 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (4.3)$$

**Tabela 4.3 – Regressão múltipla para a resposta atividade de lipase de *Geotrichum candidum***

Variáveis e interações	Coeficiente de Regressão	Desvio	t(7)	p
Termo Independente	11,49193	0,748031	15,36291	0,000001
(X1) pH (L)	2,60552	0,702563	7,41719	0,000147
pH (Q)	-2,48886	0,773273	-6,43722	0,000355
(X2) Temperatura (L)	-0,40788	0,702563	-1,16112	0,283655
Temperatura (Q)	-1,49980	0,773273	-3,87909	0,006060
(X3) Concentração (L)	1,58577	0,702563	4,51425	0,002751
Concentração (Q)	-1,90638	0,773273	-4,93069	0,001693
X1.X2	-0,26875	0,917943	-0,58555	0,576561
X1.X3	1,23125	0,917943	2,68263	0,031419
X2.X3	0,34375	0,917943	0,74896	0,478290
$R^2=0,95$				

Assim como para o planejamento experimental realizado para produção de lipase por *Candida rugosa*, a temperatura e as interações entre as variáveis X<sub>1</sub>.X<sub>2</sub> e X<sub>2</sub>.X<sub>3</sub> foram os parâmetros não significativos, que puderam ser desprezados para o nível de significância de 95% para a resposta atividade de lipase empregando *Geotrichum candidum*.

A Equação 4.4 representa o modelo para a resposta atividade de lipase empregando *Candida rugosa* com as variáveis significativas codificadas para a resposta atividade de lipase.

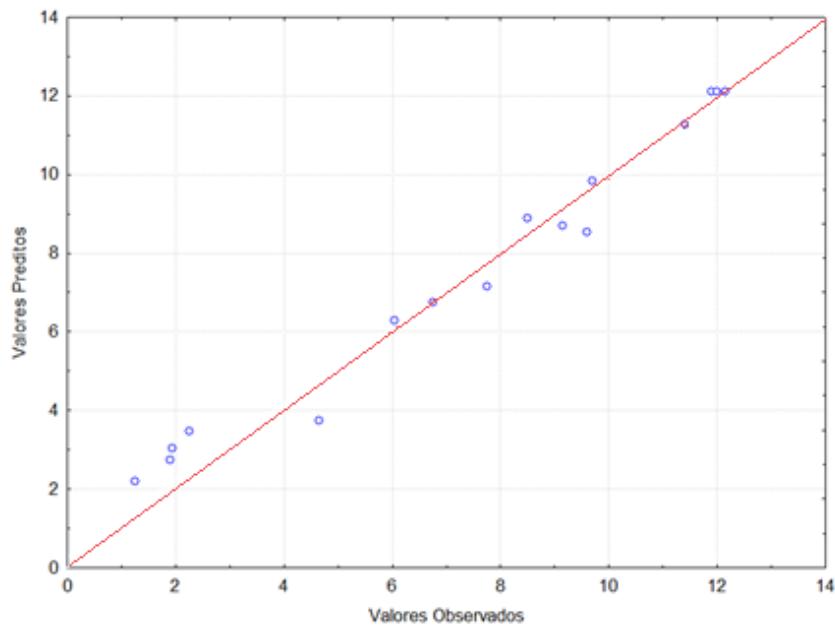
$$AL_{Gc}(\%) = 11,49 + 2,61 \cdot X_1 - 2,49 \cdot X_1^2 - 1,50 \cdot X_2^2 + 1,58 \cdot X_3 - 1,91 \cdot X_3^2 + 1,23 \cdot X_1 \cdot X_3 \quad (4.4)$$

Avaliando-se a Equação 4.4 verifica-se que, assim como para produção de lipase por *Candida rugosa*, a temperatura (X<sub>2</sub>) não exerceu influência significativa, sobre a atividade de lipase, de forma linear ou por interações com outras variáveis.

A mesma análise, feita para os coeficientes das variáveis isoladas na Equação 4.2, pode ser feita na Equação 4.4, observando que o pH (X<sub>1</sub>) contribui consideravelmente para o aumento da resposta atividade de lipase, desde que assuma valores codificados superiores ao nível central (0,0). Um aumento na concentração de melaço de soja no meio fermentativo (X<sub>3</sub>) também contribui para o aumento dessa atividade.

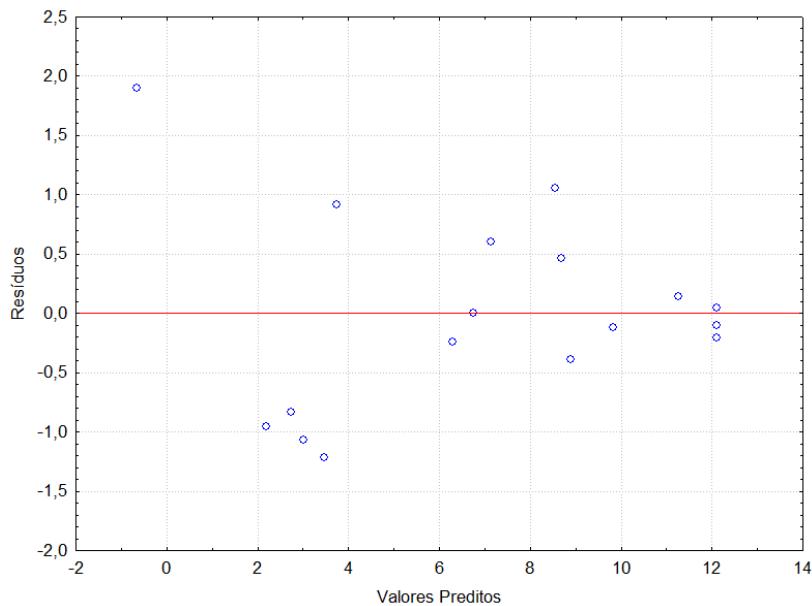
O sinal positivo dos coeficientes X<sub>1</sub> e X<sub>3</sub> indica que maiores valores do pH inicial e da concentração de melaço de soja no meio contribuem para um aumento da atividade lipolítica na produção de lipase por *Geotrichum candidum*. A Tabela 4.1 confirma a interpretação dada ao modelo, deixando evidente que valores de pH inicial (X<sub>1</sub>) e de concentrações de melaço de soja (X<sub>3</sub>) próximos aos dos pontos centrais, produzem maiores atividade de lipase.

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtido após o ajuste foi de 0,94, indicando que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 94% da variabilidade dos dados. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.12.



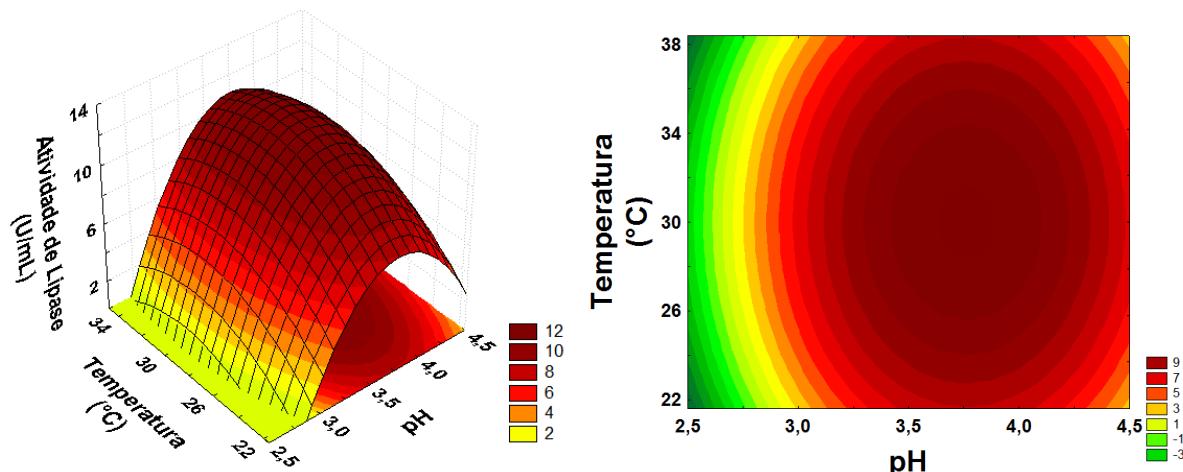
**Figura 4.12** – Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para a atividade de lipase de *Geotrichum candidum*

A Figura 4.13 mostra que os erros de ajustamento são independentes e normalmente distribuídos em torno da reta, indicando normalidade para a resposta atividade de lipase.

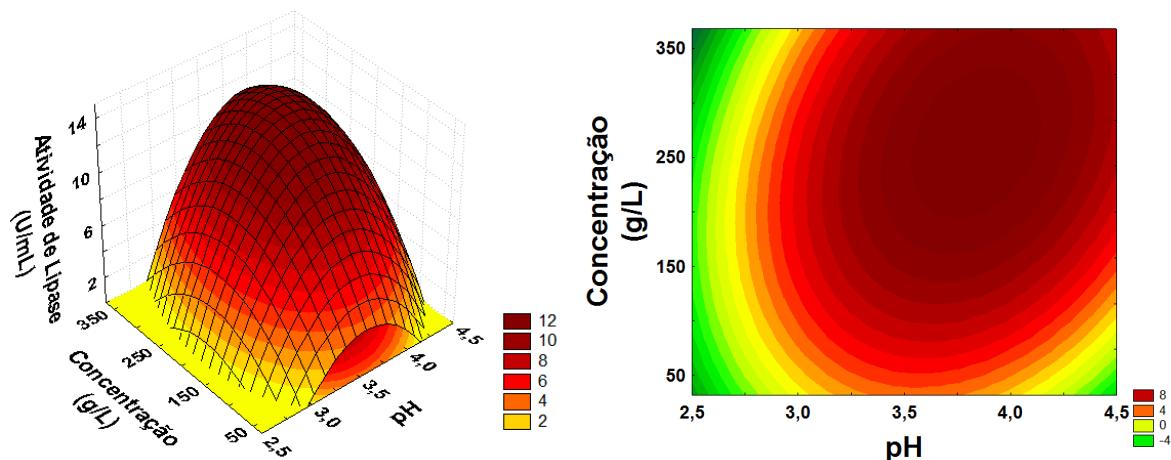


**Figura 4.13** – Distribuição dos resíduos para a resposta atividade de lipase de *Geotrichum candidum*

Como o modelo foi significativo, construiu-se as superfícies de resposta e definiu-se as regiões de interesse. A superfície de resposta e a curva de contorno em função de  $X_1$  e  $X_2$  para a atividade de lipase é ilustrada na Figura 4.14. Por se tratar de um planejamento que visa otimizar três variáveis de processo, elas serão apresentadas graficamente duas a duas junto à resposta avaliada. Sendo assim, a superfície de resposta e a curva de contorno em função de  $X_1$  e  $X_3$  é ilustrada na Figura 4.15, e a superfície de resposta e a curva de contorno em função de  $X_2$  e  $X_3$  ilustrada pela Figura 4.16.



**Figura 4.14** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta atividade de lipase (*Geotrichum candidum*) em função do pH e da temperatura de fermentação

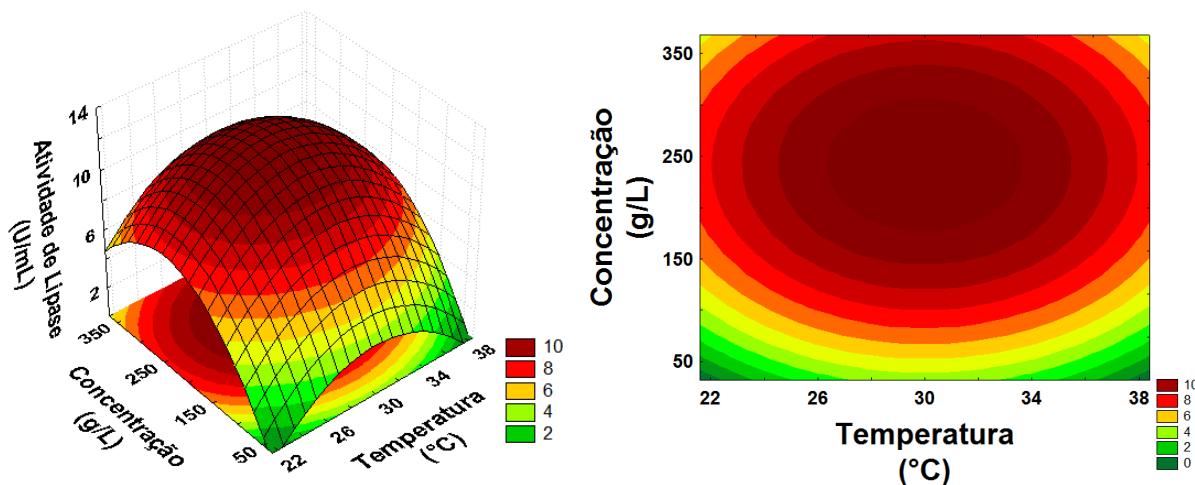


**Figura 4.15** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta atividade de lipase (*Geotrichum candidum*) em função do pH e da concentração de melaço de soja no meio

A faixa de pH inicial do meio de fermentação que maximiza a atividade de lipase foi definida a partir da análise feita nas curvas de contorno das Figuras 4.14 e 4.15.

A curva de contorno que representa o efeito do pH inicial do meio de fermentação em sinergismo com a temperatura de operação (Figura 4.14) indica uma faixa aproximada de 3,5 a 4,0 para a maximização da resposta em questão. O efeito combinado do pH inicial e da

concentração de melaço de soja no meio (Figura 4.15) indica uma faixa também de 3,6 a 4,1. Com isso, pode-se afirmar que a faixa que satisfaz ambos os efeitos combinados para maximização da atividade lipolítica na produção de lipase em melaço de soja por *Geotrichum candidum*, dentro da região experimental trabalhada, o pH inicial do meio deve estar entre 3,6 e 4,0.



**Figura 4.16** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta atividade de lipase (*Geotrichum candidum*) em função da temperatura de fermentação e da concentração de melaço de soja no meio.

Da mesma forma que para o pH inicial, a partir das curvas de contorno das Figuras 4.14 e 4.16, a faixa de temperatura de operação que maximiza a atividade lipolítica na produção de lipase por *Geotrichum candidum* na região experimental trabalhada, foi definida. A faixa aproximada de temperatura correspondente à máxima atividade de lipase está entre 27 e 32°C.

Foram analisadas as curvas de contorno das Figuras 4.15 e 4.16 para a definição da faixa de concentração de melaço de soja no meio fermentativo que maximiza a atividade lipolítica na produção de lipase por *Geotrichum candidum*. De acordo com esta análise, visando uma maior atividade de lipase é interessante que a concentração de melaço de soja no meio esteja entre 200 e 290 g/L.

Para encontrar o ponto estacionário para a atividade de lipase, ponto correspondente à maximização da resposta atividade de lipase dentro da região de otimização, realizou-se uma análise canônica utilizando o modelo completo representado pelos coeficientes de regressão mostrados na Tabela 4.4. Assim como para as respostas de atividade de lipase do caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa*, utilizou-se um algoritmo implementado no software *Maple 13* e definiram-se as condições que maximizaram a resposta atividade de

lipase: pH inicial do meio 3,8, temperatura de fermentação 29,4°C e concentração de melaço de soja no meio de 262,6 g/L. Tal resultado mostra-se em concordância à análise anterior já que todas as variáveis determinadas se encontram dentro da faixa definida.

A partir da Equação 4.4, substituindo o ponto ótimo, obteve-se uma atividade de lipase de 12,84 U/mL, valor próximo ao obtido no ponto central.

Mladenoska e Dimitrovski (2001) utilizaram *Geotrichum candidum* para produção de lipases em meio contendo óleo de semente de girassol e obtiveram uma atividade de lipase máxima de 0,28 U/mL.

Maldonado et al. (2006), estudaram os efeitos de diferentes substratos na produção de lipase por *Geotrichum candidum* em fermentação submersa a partir de meios industriais em reator tipo airlift e obtiveram uma atividade de lipase média de 24 U/mL.

Segundo Farias et al. (2012), que estudaram a produção de lipase por *Geotrichum candidum* em meio contendo óleos de andiroba como substrato, a atividade lipolítica alcançada foi de 14,09 U/mL, após 48 horas de fermentação.

Comparando-se os valores de atividade lipolítica da lipase produzida por *Geotrichum candidum*, obtidos nos experimentos e nos trabalhos citados, nota-se que no presente trabalho foram obtidos resultados com valores na média aos obtidos por Mladenoska e Dimitrovski (2001), Maldonado et al. (2006) e Farias et al. (2012).

#### **4.2.3. Reprodutibilidade do Ponto Otimizado para a Produção de Lipase**

O principal objetivo desta etapa foi verificar se ocorreria reprodutibilidade dos resultados apontados pelos modelos, quando empregadas as condições experimentais indicadas pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno e pelos pontos estacionários determinados pela utilização de rotina implementada no software *Maple 13*.

Pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno, verifica-se que:

- Para a produção de lipase em melaço de soja por *Candida rugosa* o pH deve estar na faixa de 3,4 a 4,0, a temperatura de fermentação entre 26 e 33°C e a concentração de melaço de soja no meio para fermentação deve estar entre 180 e 260 g/L para maximizar a atividade de lipase. Optou-se por trabalhar com pH inicial do meio de 3,8, contendo 200 g/L de melaço de soja fermentando à 27°C. Os valores de temperatura e concentração do melaço de soja foram escolhidos visando a questão econômica do processo. Como a concentração de melaço de soja não é um entrave

econômico, uma vez que é um co-produto do processamento do óleo de soja, optou-se por trabalhar com o valor citado. Aplicando-se tais parâmetros no experimento de validação, a fermentação resultou-se num caldo enzimático com atividade de lipase de 12,5 U/mL.

- Para a produção de lipase em melaço de soja por *Geotrichum candidum* o pH deve estar na faixa de 3,4 a 4,0, a temperatura de fermentação entre 27 e 32°C e a concentração de melaço de soja no meio para fermentação deve estar entre 200 e 290 g/L para maximizar a atividade de lipase. Como as faixas de operação que maximizem a atividade de lipase são bem próximas as da produção de lipase por *Candida rugosa*, optou-se por trabalhar com os mesmos parâmetros. Aplicando-se esses parâmetros no teste de validação, obteve-se um caldo enzimático comatividade de lipase de 11,9 U/mL.

### **4.3. Testes Preliminares para a Purificação da Lipase (Sistema Aquoso Bifásico)**

#### **4.3.1. Influência das composições das fases na atividade de lipase**

Para determinar a influência de cada composição das fases na estabilidade da lipase de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*, o caldo enzimático produzido por cada um destes micro-organismos foi misturado com alguns compostos (Etanol, 2-propanol, fosfato de potássio, citrato de sódio e sulfato de amônio). Os resultados para estes compostos são mostrados na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4** – Efeito das composições das fases na estabilidade da atividade de lipase para *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*. As concentrações de álcool e sal foram expressas em (% v/v) e (% p/v), respectivamente.

Composição das fases	Concentração	Atividade de lipase relativa	
		<i>Candida rugosa</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
Controle		100	100
Etanol	40	100,9	100,3
	80	94,8	93,9
2-propanol	40	99,6	99,4
	80	101,9	101,7
Fosfato de Potássio	20	159,3	158,5
	40	133,1	132,5
Sulfato de Amônio	20	46,7	46,5
	40	27,1	27,3
Citrato de Sódio	20	101,8	101,3
	40	78,7	77,7

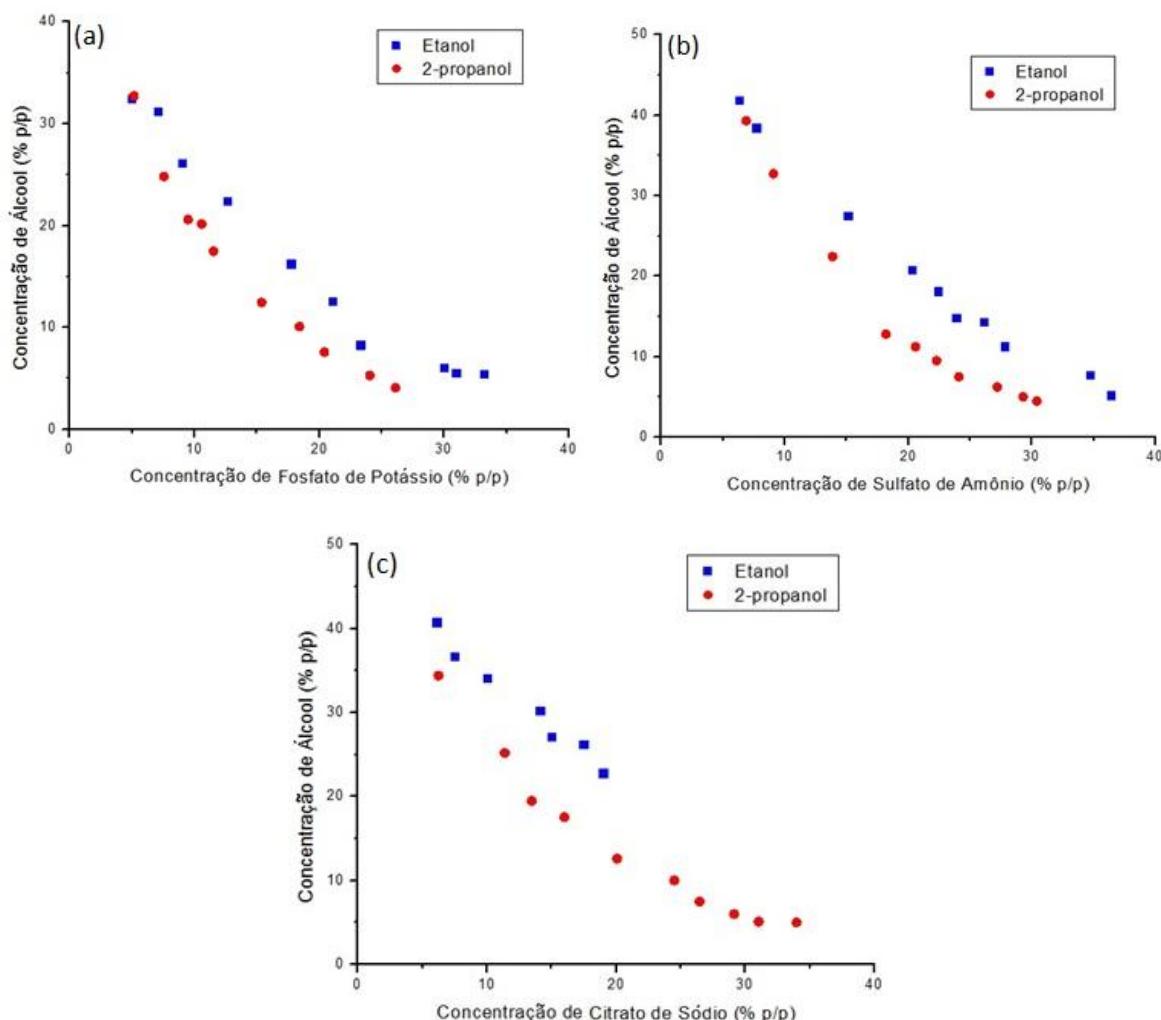
Em geral, a lipase se manteve estável na presença de etanol e 2-propanol, o que torna estes solventes orgânicos ideais componentes na aplicação do Sistema Aquoso Bifásico (SAB). Estudos anteriores demonstraram que algumas lipases podem manter a atividade catalítica altamente estável em solventes orgânicos (SAXENA et al., 2003; LIMA et al., 2004). Acredita-se que o solvente orgânico ajuda a manter a conformação aberta da enzima, expondo o sítio ativo e, assim, estimulando a atividade de lipase (RÚA et al., 1993).

Observa-se, pela Tabela 4.6, que a lipase de ambos os micro-organismos foi ligeiramente ativada em concentrações de 80% (v/v) de 2-propanol, embora tenha sido parcialmente inativada na mesma concentração de etanol. A estabilidade das lipases também foi determinada misturando o caldo enzimático em uma solução de sal a 20% (p/v) e os resultados mostraram que esta atividade é aumentada por fosfato de potássio, e, em menor grau, por citrato de sódio. No entanto, a lipase foi fortemente inibida por sulfato de amônio (a atividade relativa foi de apenas 46,7% para *Candida rugosa* e 46,5% para *Geotrichum candidum*). Uma quantidade detectável de precipitação de proteína foi observada na solução de sulfato de amônio, indicando, que o sulfato de amônio tem uma elevada capacidade de *salting-out* causando agregação de proteínas, que foi confirmada pelo teste realizado com o precipitado de proteína, dissolvido em solução tampão e testados com o ensaio de lipase. A presença de lipase foi detectada.

Os resultados também mostraram que a fase composta por uma maior concentração de solução salina a 40% (p/v), reduz a atividade de lipase se comparada com a atividade de lipase obtida na fase composta por solução salina a 20% (p/v).

### 4.3.2. Diagrama de Fases

Os diagramas de fase do etanol e 2-propanol com os três tipos de sais (fosfato de potássio, sulfato de amônio e o citrato de sódio) são mostrados na Figura 4.7 (a-c).



**Figura 4.17** – Diagramas de fase dos Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs). As curvas binodais do etanol (■) e do 2-propanol (●) foram plotadas contra (a) fosfato de potássio, (b) sulfato de amônio e (c) citrato de sódio.

De acordo com a Figura 4.17, observa-se que as curvas binodais associadas com os sistemas etanol/sal indicaram maior polaridade. Isso se deve ao fato do etanol melhorar a solubilidade e miscibilidade global dos sais (GREVE, 1991). As curvas binodais dos sistemas

2-propanol/sal se aproximaram mais da origem do que as curvas de binodais de sistemas de etanol/sal, devido à maior solubilidade deste sistema.

A curva binodal observada no diagrama de fases de etanol/citrato de sódio foi curta, indicando uma provável instabilidade deste SAB. Isto pode ser devido à baixa solubilidade do citrato de sódio em etanol, ou seja, ocorreu a precipitação deste sal.

#### 4.3.3. Seleção do Sistema Álcool/Sal-Básico

A Tabela 4.5 apresenta os resultados do estudo da partição da lipase nos SABs álcool/sal representados pelos valores de seletividade (S), fator de purificação (FP) e rendimento da enzima recuperada (R). Estes sistemas foram selecionados com base nas composições relativas dos diagramas de fase.

**Tabela 4.5** – Partição da lipase de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* em diferentes sistemas álcool/sal.

Sistemas	Concentração álcool/sal (% p/p)	<i>Candida rugosa</i>			<i>Geotrichum candidum</i>			
		S	FP	R	S	FP	R	
Etanol	<b>Fosf. Potássio</b>	20/20	224,51	10,63	95,8	194,14	9,91	93,4
	<b>Cit. Sódio</b>	24/26	142,41	9,10	96,2	124,45	8,59	92,2
	<b>Sulf. Amônio</b>	24/26	114,75	7,71	91,6	101,81	7,12	89,1
2-propanol	<b>Fosf. Potássio</b>	20/20	292,72	12,08	96,0	287,63	11,97	96,5
	<b>Cit. Sódio</b>	24/26	133,09	9,79	95,2	99,32	9,18	90,5
	<b>Sulf. Amônio</b>	24/26	155,39	6,81	94,8	107,63	6,68	91,5

Os resultados mostram que os máximos valores de seletividade e fator de purificação, para *Candida rugosa* foi de 292,72 e 12,08, respectivamente, e para *Geotrichum candidum* foi de 287,63 e 11,97, respectivamente, ambos alcançados pelo sistema 2-propanol/fosfato de potássio, implicando que o fosfato de potássio, é adequado para utilização como um sal “phaseforming” (formador de fase). Além disso, o sistema 2-propanol/fosfato de potássio apresentou bons resultados em termos de rendimento de lipase após purificação (*Candida rugosa* – 96%; *Geotrichum candidum* – 96,5%). Sabe-se que o pH é uma variável crítica na

purificação de enzimas em sistemas aquosos bifásicos. Os valores de pH gerados nos sistemas com fosfato de potássio, citrato de sódio e sulfato de amônio ficaram entre 5,5 e 6,0, 7,5 e 8,0, e 5,0 e 5,5, respectivamente.

O propanol, comparado com o etanol, possui estrutura molecular com cadeia de hidrocarbonetos mais longa e isso facilita a interação do álcool com a lipase, aumentando, assim, sua partição.

Os baixos resultados obtidos, para a purificação da lipase de ambos os micro-organismos, pelo sistema álcool/citrato de sódio, devido à baixa solubilidade do citrato de sódio em etanol, ou seja, ocorreu a precipitação deste sal, o mesmo ocorrido durante os experimentos para plotar as curvas binodais.

Analizando os dados apresentados nas Tabelas 4.7, o sistema 2-propanol/fosfato de potássio, foi escolhido para o Planejamento Composto Central, visando otimizar a purificação da lipase, para ambos os micro-organismos.

#### **4.4. Planejamento Experimental para a Purificação da Lipase (Sistema Aquoso Bifásico)**

No planejamento experimental para a purificação da lipase de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* em Sistema Aquoso Bifásico (SAB) álcool/sal, estudou-se a seletividade e o fator de purificação para ambos os micro-organismos. Estes 2 fatores foram avaliados em relação à composição das fases do SAB, variando-se a concentração de 2-propanol (% p/p) e a concentração de fosfato de potássio (% p/p), após isso, calculou-se o rendimento da enzima recuperada. Estas duas variáveis independentes que afetam o desempenho na purificação de lipase em SAB álcool/sal foram avaliadas nas faixas: concentração de 2-propanol e de fosfato de potássio (14,4 a 25,6% p/p), tanto para *Candida rugosa* quanto para *Geotrichum candidum*. A partir desses resultados experimentais pôde-se traçar o perfil dos parâmetros de operação para purificação de lipase em sistema aquoso bifásico álcool/sal.

A Tabela 4.6 mostra os valores codificados e originais das variáveis de estudo e as respostas seletividade (S) e fator de purificação (FP) para *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*.

**Tabela 4.6** – Variáveis utilizadas no PCC e a resposta de seletividade (S) e fator de purificação (FP) para *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*

Experimento	<b>X<sub>4</sub> (Conc. 2-propanol (%p/p))</b>	<b>X<sub>5</sub> (Conc. fosf. potássio (%p/p))</b>	<i>Candida rugosa</i>		<i>Geotrichum candidum</i>	
	S	FP	S	FP		
1	-1 (16)	-1 (16)	302,09	12,85	287,62	11,97
2	-1 (16)	+1 (24)	195,25	10,90	175,45	7,27
3	+1 (24)	-1 (16)	162,71	10,21	145,63	6,09
4	+1 (24)	+1 (24)	97,61	9,38	83,79	3,45
5	-α (14,4)	0 (20)	260,33	11,53	224,35	9,40
6	+ α (25,6)	0 (20)	32,54	7,29	26,95	1,25
7	0 (20)	-α (14,4)	249,52	11,04	259,29	9,69
8	0 (20)	+ α (25,6)	29,08	6,32	21,03	0,88
9 (C)	0 (20)	0 (20)	291,88	11,74	260,82	11,16
10 (C)	0 (20)	0 (20)	293,16	12,50	272,99	11,60
11 (C)	0 (20)	0 (20)	292,58	12,15	284,52	11,45

Observa-se na Tabela 4.6 que, após aplicar o SAB, o caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa* resultou numa seletividade que variou de 29,08 (experimento 8) a 302,09 (experimento 1) e o fator de purificação variando de 7,29 (experimento 8) a 12,85 (experimento 1), para o caldo enzimático resultante da fermentação por *Geotrichum candidum*, tratado em SAB a seletividade esteve entre 21,03 (experimento 8) e 287,62 (experimento 1). Verifica-se também a boa repetibilidade do processo uma vez que os pontos centrais apresentaram uma pequena variação para todas as respostas.

Pode-se observar que, para ambos os micro-organismos, os maiores valores da seletividade e do fator de purificação ocorreram nos experimentos 1 e nos pontos centrais do planejamento experimental, e que o menor valor dessas respostas ocorreu para altas concentrações de 2-propanol.

O nível de significância considerado foi de 95%, ou seja, foram considerados significativos os parâmetros em que  $p < 0,05$ .

Com os resultados apresentados na Tabela 4.8, foi possível analisar estatisticamente o comportamento de cada resposta. Então, determinaram-se os coeficientes de regressão após a realização da regressão múltipla no programa Statistica 7.0.

#### 4.4.1 Seletividade

A Tabela 4.7 apresenta os coeficientes de regressão das variáveis e interações com parâmetros significativos e não significativos, além dos níveis de significância, desvio e valor

do teste de *t de student* associado a cada um, para o caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa*.

A Equação 4.5 refere-se ao modelo, considerando parâmetros significativos e não significativos da seletividade para o caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa*.

$$\text{Seletividade}_{(\text{Cr})} = 292,54 - 69,89 \cdot X_4 - 61,42 \cdot X_4^2 - 60,46 \cdot X_5 - 64,98 \cdot X_5^2 + 10,43 \cdot X_4 \cdot X_5 \quad (4.5)$$

**Tabela 4.7** – Regressão múltipla para a resposta seletividade da lipase de *Candida rugosa*

Variáveis e interações	Coeficiente de Regressão	Desvio	t(5)	p
Termo Independente	292,5398	22,63242	12,92570	0,000049
(X <sub>4</sub> )Conc. 2-propanol(L)	-69,8955	27,71898	-5,04315	0,003956
Conc. 2-propanol (Q)	-61,4157	32,99226	-3,72304	0,013669
(X <sub>5</sub> )Conc. Fosf. Potássio(L)	-60,4612	27,71898	-4,36244	0,007274
Conc. Fosf. Potássio (Q)	-64,9832	32,99226	-3,93930	0,010968
X <sub>4</sub> .X <sub>5</sub>	10,4350	39,20051	0,53239	0,617255
<b>R<sup>2</sup>=0,93</b>				

Os coeficientes de regressão das variáveis e interações com parâmetros significativos e não significativos, além dos níveis de significância de 95%, desvio e valor do teste de *t de student* associado a cada um, para o caldo enzimático fermentado por *Geotrichum candidum*, são apresentados na Tabela 4.8.

A Equação 4.6 refere-se ao modelo, considerando os dados apresentados na Tabela 4.10.

$$\text{Seletividade}_{(\text{Gc})} = 328,68 - 59,74 \cdot X_4 - 45,53 \cdot X_4^2 - 59,27 \cdot X_5 - 31,02 \cdot X_5^2 + 121,99 \cdot X_4 \cdot X_5 \quad (4.6)$$

**Tabela 4.8** – Regressão múltipla para a resposta seletividade da lipase de *Geotrichum candidum*

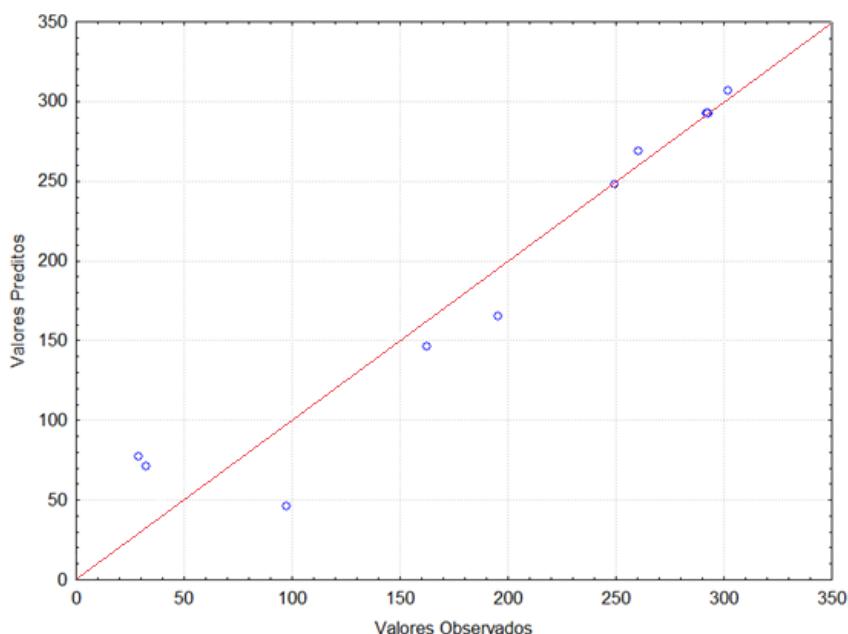
Variáveis e interações	Coeficiente de Regressão	Desvio	t(5)	p
Termo Independente	328,6775	21,74642	12,54352	0,000057
(X <sub>4</sub> )Conc. 2-propanol(L)	-59,7396	26,63385	-4,81358	0,004826
Conc. 2-propanol (Q)	-45,5289	31,70069	-4,00679	0,010254
(X <sub>5</sub> )Conc. Fosf. Potássio(L)	-59,2758	26,63385	-4,79616	0,004900
Conc. Fosf. Potássio (Q)	-31,0188	31,70069	-3,54907	0,016404
X <sub>4</sub> .X <sub>5</sub>	121,9883	37,66590	0,66811	0,533660
<b>R<sup>2</sup>=0,93</b>				

As equações resultantes após a eliminação dos parâmetros não significativos, com  $p > 0,05$  são apresentadas pela Equação 4.7 e Equação 4.8 para *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*, respectivamente.

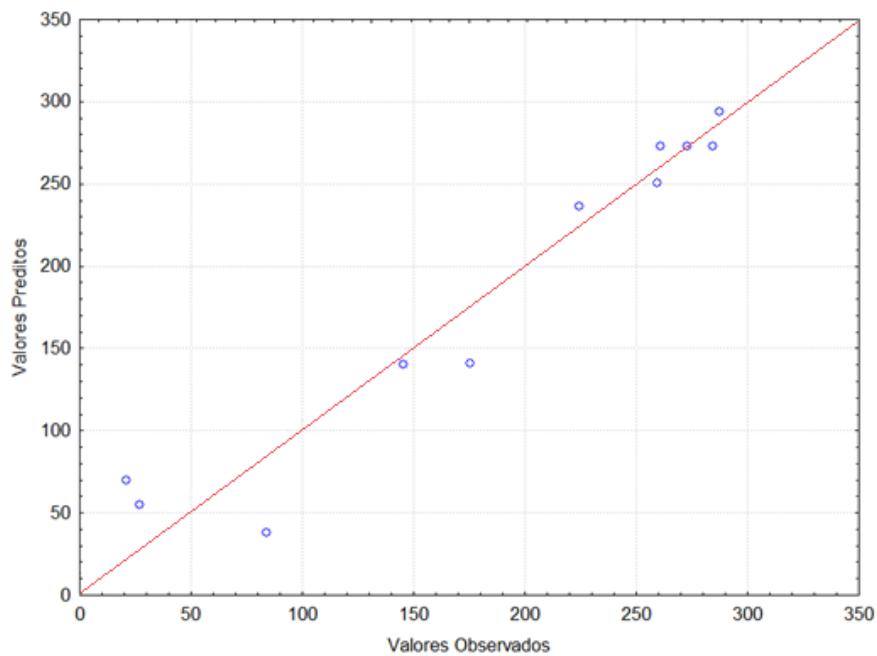
$$\text{Seletividade}_{(\text{Cr})} = 292,54 - 69,89 \cdot X_4 - 61,41 \cdot X_4^2 - 60,46 \cdot X_5 - 64,98 \cdot X_5^2 \quad (4.7)$$

$$\text{Seletividade}_{(\text{Gc})} = 272,78 - 64,10 \cdot X_4 - 63,51 \cdot X_4^2 - 63,87 \cdot X_5 - 56,25 \cdot X_5^2 \quad (4.8)$$

O coeficiente de regressão ( $R^2$ ) obtido após o ajuste, para a resposta de seletividade da análise do caldo enzimático para ambos os micro-organismos, foi de 0,93, indicando que a equação empírica proposta reproduz com fidelidade os resultados obtidos experimentalmente. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, como mostra a Figura 4.18 e Figura 4.19.



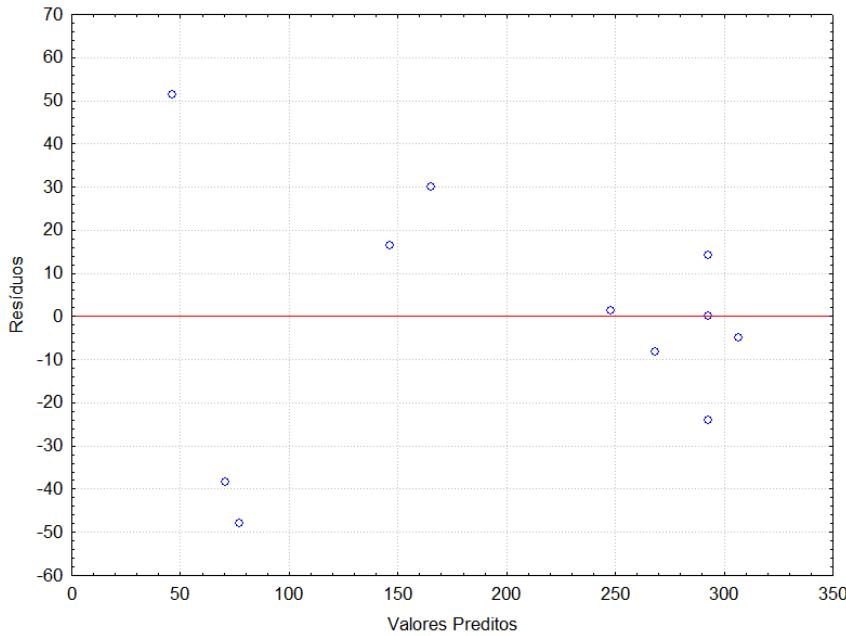
**Figura 4.18** – Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para a seletividade da lipase de *Candida rugosa*



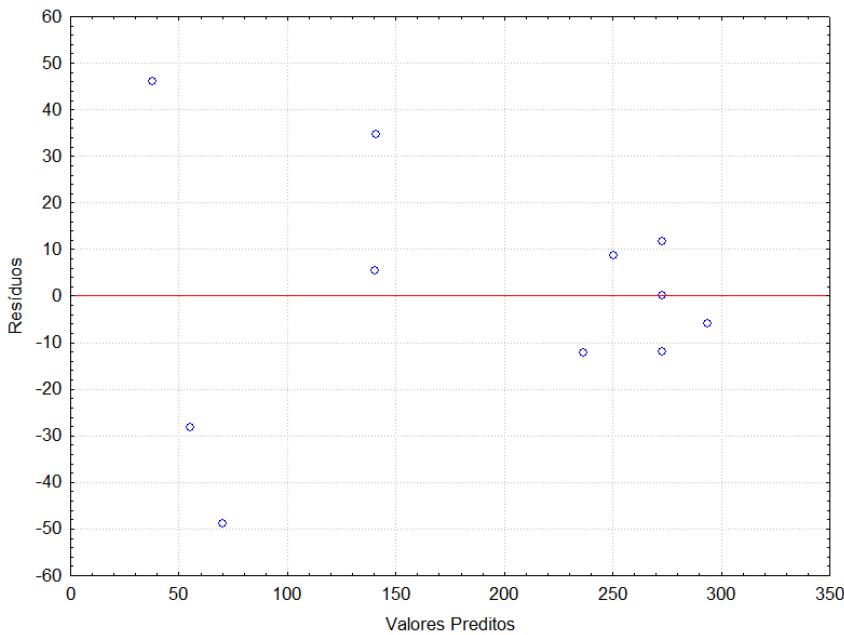
**Figura 4.19** – Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para a seletividade da lipase de *Geotrichum candidum*

Os parâmetros não significativos eliminados para ambos os casos foram as interações entre as variáveis  $X_4.X_5$ , que apresentaram  $p > 0,05$ . Pode-se perceber pela análise das Equações 4.7 e 4.8, que tanto o efeito de concentração do 2-propanol como o efeito da concentração de fosfato de potássio atuam de forma bastante expressivas e aproximadas, na seletividade.

Observando a Figura 4.20 e Figura 4.21, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando qualquer tendência quanto à distribuição.

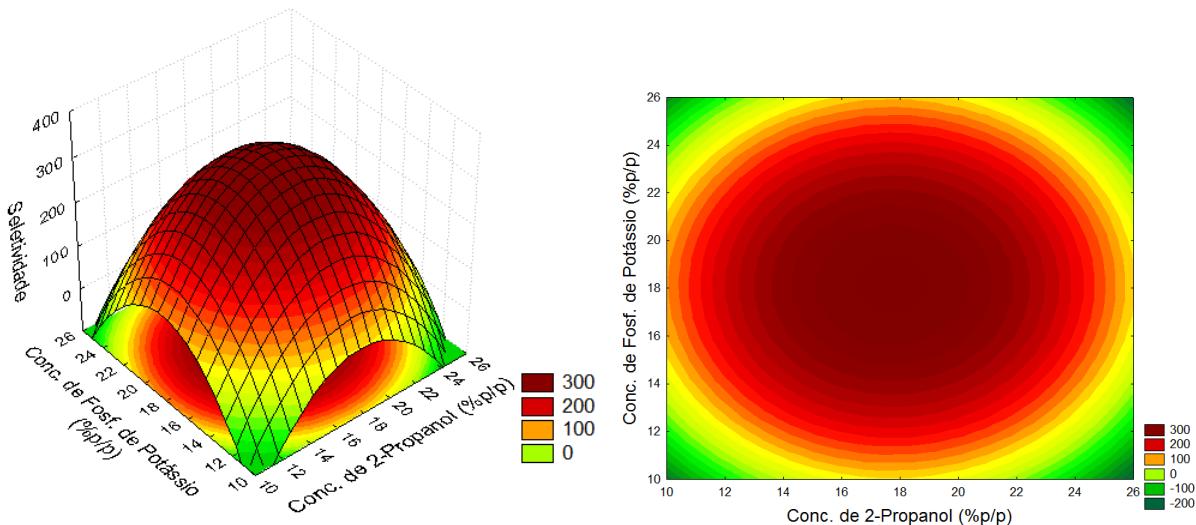


**Figura 4.20** - Distribuição dos resíduos para a resposta seletividade da lipase de *Candida rugosa*

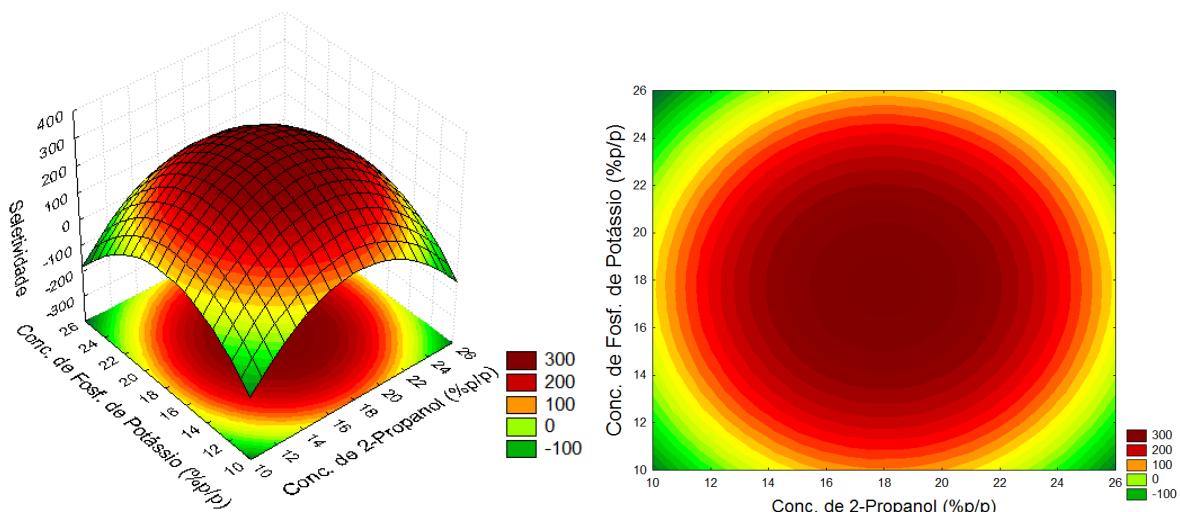


**Figura 4.21** - Distribuição dos resíduos para a resposta seletividade da lipase de *Geotrichum candidum*

Nesse caso, foi possível, construir as superfícies de resposta e definir a região de interesse. As Figuras 4.22 e 4.23 ilustram a superfície de resposta e a curva de contorno em função da concentração de 2-propanol (% p/p) ( $X_4$ ) e da concentração de fosfato de potássio (% p/p) ( $X_5$ ) para a seletividade do caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*, respectivamente.



**Figura 4.22** – Superfície de resposta e curva de contorno para a seletividade (*Candida rugosa*) em função da concentração de 2-propanol e da concentração de fosfato de potássio



**Figura 4.23** – Superfície de resposta e curva de contorno para a seletividade (*Geotrichum candidum*) em função da concentração de 2-propanol e da concentração de fosfato de potássio

Analizando as curvas de contorno das Figuras 4.22 definiu-se a faixa de concentração de 2-propanol e a concentração de fosfato de potássio que maximiza a seletividade para o caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa* após o tratamento no SAB. Pode-se afirmar que, para maximização da dessa seletividade, na região experimental adotada, a concentração de 2-propanol e a concentração de fosfato de potássio devem estar entre 16 e 20 % p/p.

Da mesma forma que para variável relacionada à seletividade para o caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa* após o tratamento no SAB, a partir das curvas de contorno da Figura 4.23 definiu-se a faixa de concentração de 2-propanol e a concentração de fosfato de potássio que maximiza a seletividade para o caldo enzimático fermentado por *Geotrichum*

*candidum* após o tratamento no SAB, na região experimental trabalhada. Pode-se afirmar que, para maximização dessa seletividade, na região experimental adotada, a concentração de 2-propanol deve estar entre 16 e 20 % p/p e a concentração de fosfato de potássio deve estar na faixa de 15 a 19 % p/p.

Com o objetivo de encontrar o ponto estacionário para a seletividade do caldo enzimático fermentado por ambos os micro-organismos, ou seja, o ponto correspondente de maximização da resposta seletividade dentro da região de otimização foi realizada a implementação de um algoritmo no programa *Maple 13*. Este procedimento foi adotado com intuito de definir a condição operacional dentro da região de otimização. As condições que maximizaram a resposta seletividade foram: concentração de 2-propanol 17,6% p/p e concentração de fosfato de potássio 17,9% p/p, para *Candida rugosa* e, concentração de 2-propanol 17,7% p/p e concentração de fosfato de potássio 17,5% p/p, para *Geotrichum candidum*.

A seletividade obtida a partir das equações dos modelos (Equação 4.7 e Equação 4.8), quando substituído as condições do ponto ótimo calculado, foi 329,50, para o caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa* e, 350,23, para o caldo enzimático fermentado por *Geotrichum candidum*.

Tal resultado mostra-se em concordância à análise das superfícies de resposta e curvas de contorno anteriores, uma vez as variáveis determinadas se encontram dentro da faixa definida.

Comparando-se os valores de seletividade obtidos no presente trabalho com outros estudos, observa-se que o SAB álcool/sal-básico é uma maneira eficiente para purificação de lipase microbiana. Enquanto o modelo obtido sugere uma seletividade de 329,50 para o caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa* e, 350,23, para o caldo enzimático fermentado por *Geotrichum candidum*, de acordo com Ooi et al. (2009) que utilizaram o mesmo sistema citado neste trabalho para purificar lipase de *Burkholderia pseudomalei*, alcançaram uma seletividade média de 302,1.

Silva et al. (1997), estudaram purificação da  $\beta$ -galactosidase de *Klueveromyces lactis* em SAB composto por PEG/Dextrana, encontraram uma seletividade média de 91,76.

Utilizando SAB composto por polietilenoglicol e fosfato de potássio para purificar lipase de *Bacillus*, Barbosa (2011), encontrou uma seletividade média de 201,53.

Abbas et al. (2002), utilizaram para a precipitação da proteína, sulfato de amônio 75% (m/v) à 0°C, para purificar lipase de *Mucor sp.*, produzida em polpa de fruta, obtendo uma atividade seletividade média de 129. Resultados semelhantes foram verificados por Castilho

et al. (2000) para a purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por *Rhizopus* sp., para a precipitação da proteína, o sulfato de amônio foi utilizado numa concentração de 70% e obteve-se uma seletividade média de 103.

#### 4.4.2 Fator de Purificação

Outra variável resposta analisada foi fator de purificação, ou seja, quantas vezes a atividade de lipase específica foi aumentada no caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*, após passarem pelo SAB álcool/sal-básico. É interessante que essa variável seja maximizada, afinal se deseja que a atividade de lipase específica aumente, pois tal fato resultaria num caldo enzimático com alta atividade lipolítica, sendo necessária uma baixa quantidade dele, para uma reação de transesterificação, por exemplo.

Na Tabela 4.9 e Tabela 4.10 podem ser vistos os coeficientes de regressão das variáveis e interações, incluindo os parâmetros significativos e não significativos para a resposta fator de purificação do caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*, respectivamente, após passarem pelo SAB álcool/sal-básico. Nesta tabela podem ser vistos, também, os valores dos níveis de significância relacionados aos parâmetros, o desvio padrão com relação a cada um, e o valor do teste de *t de student* associado.

**Tabela 4.9** – Regressão múltipla para a resposta fator de purificação da lipase de *Candida rugosa*

Variáveis e interações	Coeficiente de Regressão	Desvio	t(5)	p
Termo Independente	12,13000	0,440647	27,52770	0,000001
(X <sub>4</sub> )Conc. 2-propanol(L)	-1,28670	0,539681	-4,76838	0,005022
Conc. 2-propanol (Q)	-0,98562	0,642350	-3,06881	0,027821
(X <sub>5</sub> )Conc. Fosf. Potássio(L)	-1,30689	0,539681	-4,84319	0,004702
Conc. Fosf. Potássio (Q)	-1,50313	0,642350	-4,68009	0,005433
X <sub>4</sub> .X <sub>5</sub>	0,53000	0,763223	1,38885	0,223564
<i>R</i> <sup>2</sup> =0,94				

**Tabela 4.10** – Regressão múltipla para a resposta fator de purificação da lipase de *Geotrichum candidum*

Variáveis e interações	Coeficiente de Regressão	Desvio	t(5)	p
Termo Independente	11,40333	0,853894	13,35450	0,000042
(X <sub>4</sub> )Conc. 2-propanol(L)	-2,65323	1,045804	-5,07406	0,003854
Conc. 2-propanol (Q)	-2,56667	1,244758	-4,12396	0,009139
(X <sub>5</sub> )Conc. Fosf. Potássio(L)	-2,47490	1,045804	-4,73302	0,005182
Conc. Fosf. Potássio (Q)	-2,58667	1,244758	-4,15610	0,008858
X <sub>4</sub> .X <sub>5</sub>	0,51500	1,478988	0,69642	0,517204
<i>R</i> <sup>2</sup> =0,94				

Por esta análise, obtém-se a Equação 4.9, para fator de purificação do caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa*, e a Equação 4.10, para o fator de purificação do caldo enzimático fermentado por *Geotrichum candidum*.

$$\text{Fator de Purificação (Cr)} = 12,13 - 1,29 \cdot X_4 - 0,99 \cdot X_4^2 - 1,31 \cdot X_5 - 1,50 \cdot X_5^2 + 0,53 \cdot X_4 \cdot X_5 \quad (4.9)$$

$$\text{Fator de Purificação (Gc)} = 11,40 - 2,65 \cdot X_4 - 2,57 \cdot X_4^2 - 2,48 \cdot X_5 - 2,59 \cdot X_5^2 + 0,52 \cdot X_4 \cdot X_5 \quad (4.10)$$

A equação do modelo, considerando apenas os parâmetros significativos (p) menores que 5% é dada pela Equação 4.11, para fator de purificação do caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa*, e a Equação 4.12, para o fator de purificação do caldo enzimático fermentado por *Geotrichum candidum*.

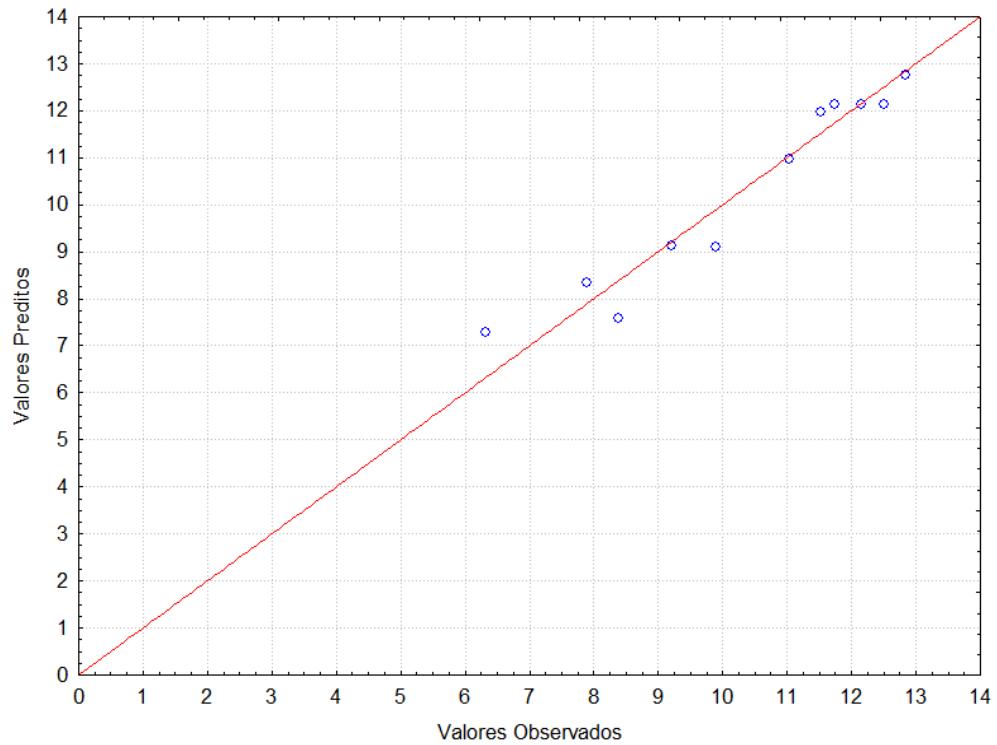
$$\text{Fator de Purificação (Cr)} = 12,13 - 1,29 \cdot X_4 - 0,99 \cdot X_4^2 - 1,31 \cdot X_5 - 1,50 \cdot X_5^2 \quad (4.11)$$

$$\text{Fator de Purificação (Gc)} = 11,40 - 2,65 \cdot X_4 - 2,57 \cdot X_4^2 - 2,48 \cdot X_5 - 2,59 \cdot X_5^2 \quad (4.12)$$

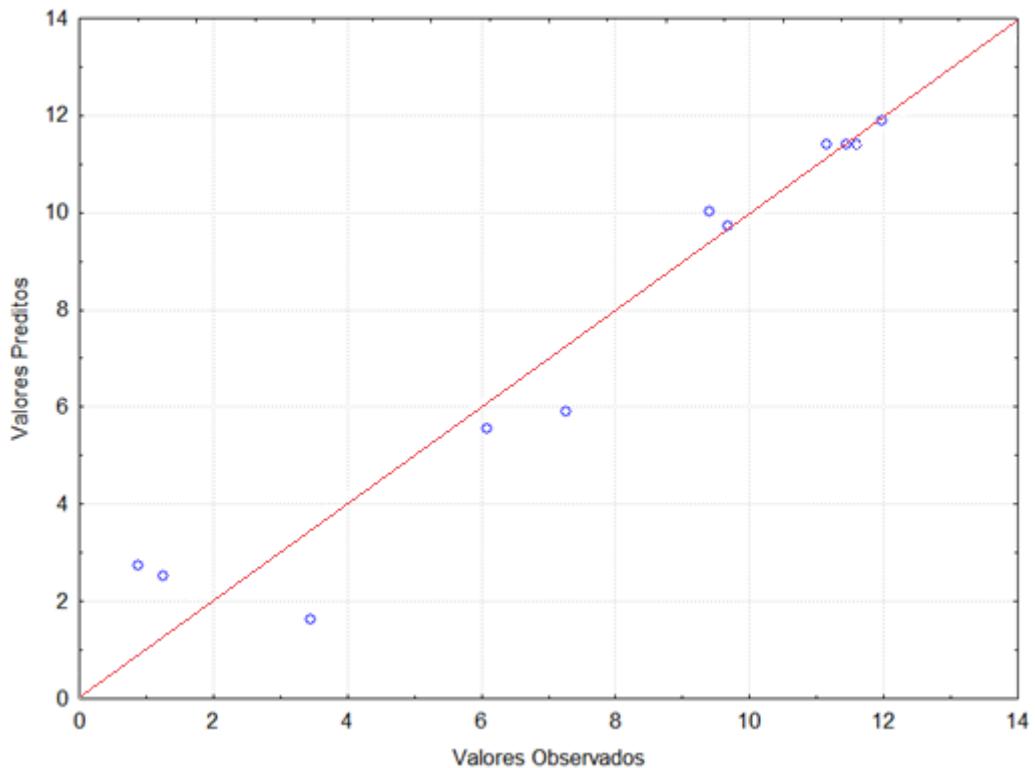
Pode-se perceber que, assim como na resposta seletividade, a interação  $X_4 \cdot X_5$  não exerceu influência sobre a resposta fator de purificação para o nível de significância adotado para ambos os micro-organismos.

Obteve-se, após a retirada dos parâmetros não significativos, um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,91, para o fator de purificação do caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa*, após tratamento com SAB, indicando que os resultados são explicados pela equação empírica proposta com 91% da variabilidade dos dados e, um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,93, para o fator de purificação do caldo enzimático fermentado por *Geotrichum candidum*, após tratamento com SAB, indicando que os resultados são explicados pela equação empírica proposta com 93% da variabilidade dos dados.

Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, e são expressos na Figura 4.24 e Figura 4.25.



**Figura 4.24** – Valores preditos pelo modelo por valores experimentais para a resposta fator de purificação da lipase de *Candida rugosa*

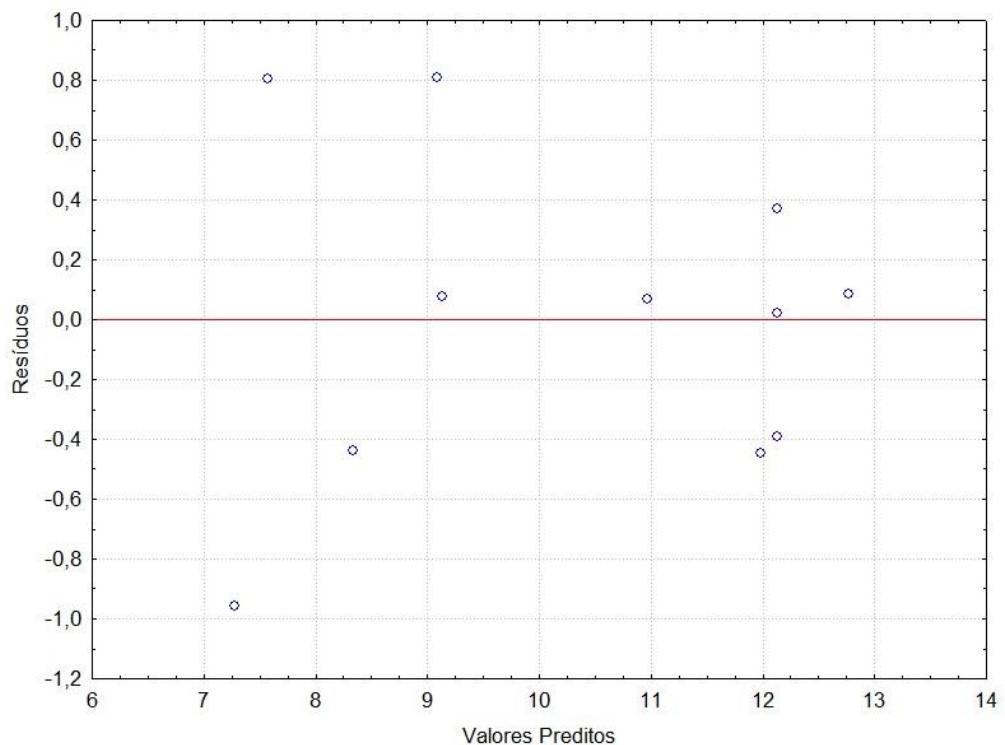


**Figura 4.25** – Valores preditos pelo modelo por valores experimentais para a resposta fator de purificação da lipase de *Geotrichum candidum*

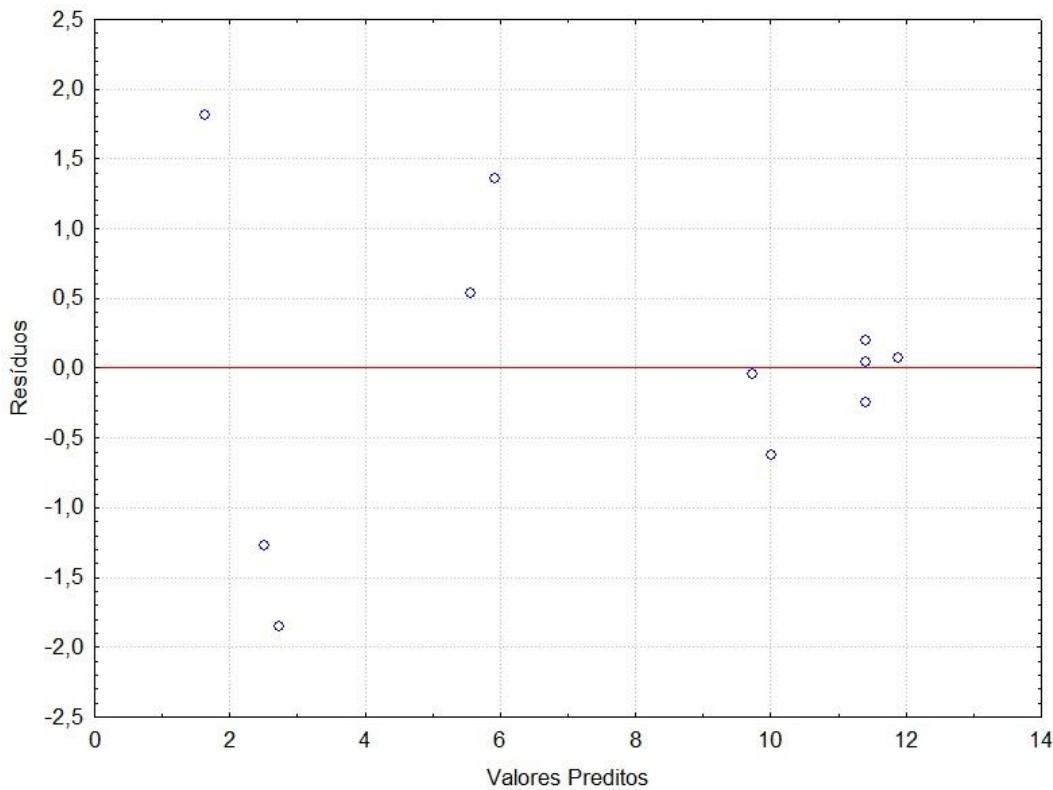
Pode-se perceber pela análise das Equações 4.7 e 4.8, que tanto o efeito de concentração do 2-propanol como o efeito da concentração de fosfato de potássio atuam de formas aproximadas, para a seletividade.

Pela análise das Equações 4.9 e 4.10 pode-se verificar que, assim como para seletividade, tanto o efeito de concentração do 2-propanol como o efeito da concentração de fosfato de potássio atuam de forma aproximadas, na seletividade, devido à magnitude destes parâmetros.

Nas Figuras 4.26 e 4.27 observa-se que os erros de ajustamento se mostram independentes e normalmente distribuídos em torno da reta, o que indica normalidade para a resposta fator de purificação do caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*, respectivamente.

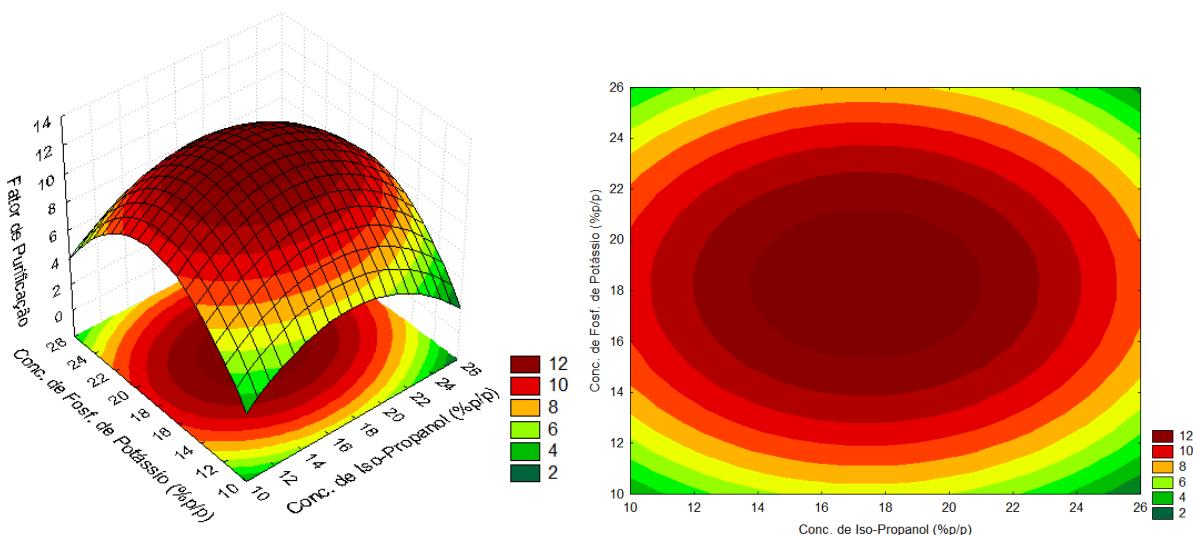


**Figura 4.26** – Distribuição dos resíduos para a resposta fator de purificação da lipase de *Candida rugosa*

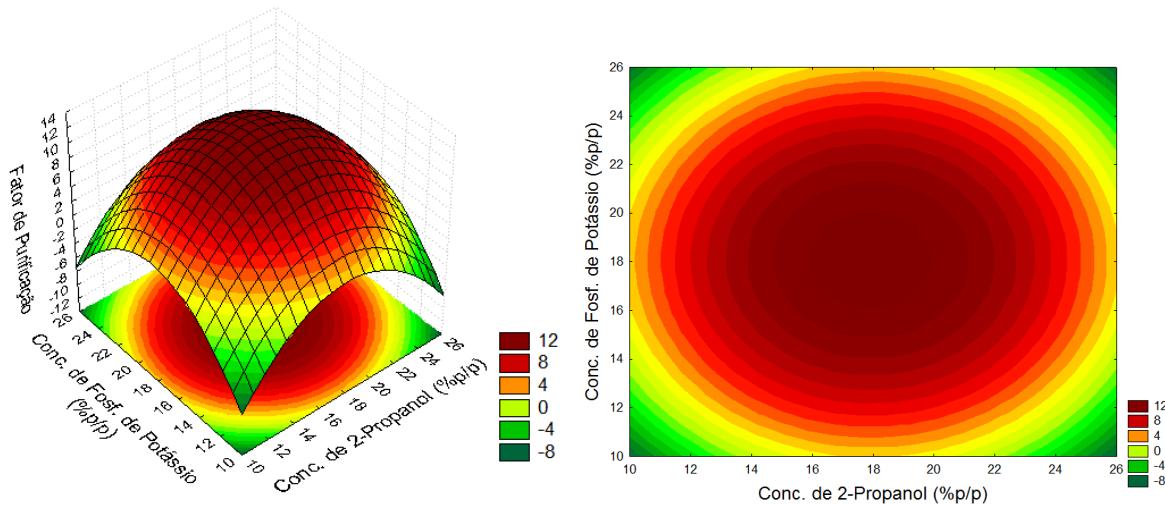


**Figura 4.27** – Distribuição dos resíduos para a resposta fator de purificação da lipase de *Geotrichum candidum*

Para ilustrar os efeitos das variáveis no fator de purificação, estão apresentadas na Figura 4.28 a superfície de resposta e a curva de contorno para associação das variáveis do planejamento, para o caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa* após tratamento com SAB álcool/sal-básico.



**Figura 4.28** – Superfície de resposta e curva de contorno para fator de purificação (*Candida rugosa*) em função da concentração de 2-propanol e da concentração de fosfato de potássio



**Figura 4.29** – Superfície de resposta e curva de contorno para fator de purificação (*Geotrichum candidum*) em função da concentração de 2-propanol e da concentração de fosfato de potássio

A curva de contorno da Figura 4.28, que representa o efeito da concentração de 2-propanol em combinação com a concentração de fosfato de potássio indica a maximização da resposta em questão. Buscando-se uma faixa que satisfaça os efeitos combinados, pode-se afirmar que, para maximização do fator de purificação do caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa* após tratamento com SAB álcool/sal-básico, na região experimental adotada, a concentração de 2-propanol deve estar na faixa de 14 a 21% p/p e, a concentração de fosfato de potássio deve estar entre 16 e 21% p/p.

Da mesma forma que para variável relacionada ao fator de purificação do caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa* após o tratamento no SAB, a partir das curvas de contorno da Figura 4.29 definiu-se a faixa de concentração de 2-propanol e a concentração de fosfato de potássio que maximiza o fator de purificação para o caldo enzimático fermentado por *Geotrichum candidum* após o tratamento no SAB, na região experimental trabalhada. Pode-se afirmar que, para maximização da resposta em questão, na região experimental adotada, a concentração de 2-propanol deve estar entre 16 e 20 % p/p e a concentração de fosfato de potássio deve estar na faixa de 16,5 a 19,5 % p/p.

Com o objetivo de encontrar o ponto correspondente à maximização da resposta fator de purificação para os caldos enzimáticos de ambos os micro-organismos, tratados com SAB álcool/sal-básico, dentro da região de otimização, realizou-se uma análise canônica utilizando o modelo completo representado pelos coeficientes de regressão mostrados na Tabela 4.9 e Tabela 4.10. Foi possível definir as condições que maximizaram o fator de purificação pela utilização de um algoritmo implementado no software *Maple 13*. As condições que maximizaram a resposta seletividade foram: concentração de 2-propanol 16,8% p/p e

concentração de fosfato de potássio 17,7% p/p, para *Candida rugosa* e, concentração de 2-propanol 17,7% p/p e concentração de fosfato de potássio 17,9% p/p, para *Geotrichum candidum*.

A seletividade obtida a partir das equações dos modelos (Equação 4.9 e Equação 4.10), quando substituído as condições do ponto ótimo calculado, foi 13,03, para o caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa* e, 12,82, para o caldo enzimático fermentado por *Geotrichum candidum*.

Este resultado mostrou-se em concordância com a análise das superfícies de resposta e curvas de contorno, uma vez as variáveis determinadas se encontram dentro da faixa definida tanto para a resposta de fator de purificação quanto para a resposta de seletividade do caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*, após tratamento com SAB álcool/sal-básico.

Comparando-se os valores de fator de purificação obtidos no presente trabalho com outros estudos, assim como para os dados de seletividade encontrados, observa-se que o SAB álcool/sal-básico é uma maneira eficiente para purificação de lipase microbiana.

Ooi et al. (2009) empregaram o mesmo sistema citado neste trabalho para purificar lipase de *Burkholderia pseudomalei*, alcançaram fator de purificação médio de 12,6, valor este próximo ao obtido no presente trabalho de acordo com o modelo obtido que apresentou um fator de purificação de 13,03 para o caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa* e 12,82 para o caldo enzimático fermentado por *Geotrichum candidum*.

Silva et al. (1997), estudaram purificação da β-galactosidase de *Klueveromyces lactis* em SAB composto por PEG/Dextrana, encontraram um fator de purificação médio de 3,9.

Utilizando SAB composto por polietilenoglicol e fosfato de potássio para purificar lipase de *Bacillus*, Barbosa (2011), encontrou um fator de purificação médio de 2,87.

Kambourouva et al. (2003) purificaram lipase termoestável produzida por *Bacillus stearothermophilus* MC 7 através do método que consistiu na ultrafiltração, cromatografia em gel e cromatografia de troca iônica, obtendo um fator de purificação de 19,25.

Kumar et al. (2005) estudaram a purificação da lipase produzida por *Bacillus coagulans* através da precipitação das proteínas com sulfato de amônio, seguida da ressuspensão e diálise com tampão tris-HCl 0,1 M, e coluna de troca aniônica e obtiveram um fator de purificação de 16.

#### 4.4.3 Rendimento da Enzima Recuperada

Após analisar as superfícies de respostas e as curvas de contornos, determinada as faixas de operação dos os parâmetros de concentração de 2-propanol e concentração de fosfato de potássio, que maximizaram, após tratamento com SAB álcool/sal-básico, os resultados de seletividade e fator de purificação do caldo enzimático fermentado por *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*, utilizando a Equação 3.8, calculou-se para cada um deles, o rendimento da enzima recuperada.

O caldo fermentado por *Candida rugosa*, após tratamento com SAB álcool/sal-básico, obteve-se um rendimento médio de 95,5% na faixa de operação otimizada, valor próximo ao encontrado no caldo fermentado por *Geotrichum candidum*, após tratamento com SAB álcool/sal-básico, que obteve-se um rendimento médio de 96,3%.

Abbas et al. (2002), utilizaram para a precipitação da proteína, sulfato de amônio 75% (m/v) à 0°C, para purificar lipase de *Mucor sp.*, produzida em polpa de fruta, obtendo um rendimento total de 99%.

Kambourouva et al. (2003) purificaram lipase termoestável produzida por *Bacillus stearothermophilus* MC 7 através do método que consistiu na ultrafiltração, cromatografia em gel e cromatografia de troca iônica, obtendo um rendimento de 10,2%.

Kumar et al. (2005) estudaram a purificação da lipase produzida por *Bacillus coagulans* através da precipitação das proteínas com sulfato de amônio, seguida da ressuspensão e diálise com tampão tris-HCl 0,1 M, e coluna de troca aniônica, um rendimento médio de 38,7%.

Chen et al. (2007) propuseram a purificação da lipase produzida por *Bacillus cereus* C71 utilizando sulfato de amônio até 60% para precipitação, seguida de cromatografia de interação hidrofóbica, coluna de troca aniônica finalizando com coluna CIM QA (material monolítico polimérico com alta eficiência), o resultado obtido foi rendimento de 18%.

Gaur et al. (2008) purificaram lipase produzida por *Pseudomonas aeruginosa*, pelo método de ultrafiltração em membrana (33 kDa), seguida de liofilização em coluna Sephadex G-100, obtiveram um rendimento de 51,6%.

Comparando com dados da literatura, nota-se que os valores de rendimento da enzima recuperada encontrados neste trabalho, são superiores, o que confirma a eficiência da aplicação do Sistema Aquoso Bifásico composto por álcool e solução de sal básico, para purificação da lipase microbiana.

#### 4.4.4. Reprodutibilidade do Ponto Otimizado para a Purificação

O principal objetivo desta etapa foi verificar se ocorreria reprodutibilidade dos resultados apontados pelos modelos, quando empregadas as condições experimentais indicadas pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno e pelos pontos estacionários determinados pela utilização de rotina implementada no software *Maple 13*.

Pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno, verifica-se que:

- Para a purificação da lipase de *Candida rugosa* utilizando o Sistema Aquoso Bifásico composto por álcool e solução de sal básico, a concentração de 2-propanol e de fosfato de potássio devem estar na faixa de 16 a 20% p/p, para maximizar a seletividade e, essas concentrações devem estar entre 14 e 21% p/p, para maximizar o fator de purificação. A fim de obter o melhor resultado que atenda tanto a seletividade quanto ao fator de purificação, optou-se por aplicar um SAB composto por 16% p/p de 2-propanol e 17% p/p de fosfato de potássio. Com esses parâmetros definidos, realizou-se um experimento de validação resultando em uma seletividade de 294,17 e fator de purificação de 12,38, além disso, calculou-se o rendimento da enzima recuperada obtendo-se 95,7%.
- Para a purificação da lipase de *Geotrichum candidum* utilizando o Sistema Aquoso Bifásico composto por álcool e solução de sal básico, visando maximizar a seletividade e o fator de purificação, a concentração de 2-propanol deve ser entre 16 e 20% p/p, e a concentração de fosfato de potássio deve estar na faixa de 15 a 19% p/p para melhor seletividade e, de 17 a 20% p/p para melhores valores do fator de purificação. Com o objetivo de obter-se um resultado que atenda os dois resultados de interesse, optou-se por aplicar um SAB nas mesmas concentrações propostas para lipase de *Candida rugosa*. Os resultados alcançados, após experimento de validação, foram seletividade de 269,39, fator de purificação de 11,53 e rendimento da enzima recuperada obtendo-se 96,8%.

Os valores obtidos pelos experimentos e os modelos estão bastante próximos, o que indica que houve reprodutibilidade dos resultados tanto em termos de atividade de lipase, para produção por ambos os micro-organismos, quanto de seletividade e fator de purificação, após tratamento em SAB composto de álcool/sal-básico.

## CAPÍTULO 5

# CONCLUSÕES

- A partir dos resultados alcançados nos testes para produção de lipase em melaço de soja, foi possível concluir que na condição selecionada dentro da região de otimização: concentração de melaço de soja no meio de 200 g/L, com pH inicial 3,5 e uma temperatura de fermentação  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , os valores obtidos para a atividade da lipase produzida pela *Candida rugosa* e pela *Geotrichum candidum* foram em média de 12,02 U/mL e 11,48 U/mL, respectivamente.
- A análise conjunta das varáveis: concentração de melaço de soja, pH e temperatura de fermentação, pelo planejamento composto central e da técnica de superfície de resposta proporcionaram aumento de 129% na atividade da lipase produzida pela *Candida rugosa* e de 84% na atividade da lipase produzida pela *Geotrichum candidum*.
- Para a aplicação do Sistema Aquoso Bifásico composto por álcool e sal básico, conclui-se que na condição selecionada, dentro da região de otimização: 16% (p/p) 2-propanol e 17% (p/p) fosfato de potássio, os valores obtidos para a seletividade e rendimento da lipase produzida por *Candida rugosa* foram em média 292,54 e 95,57%, respectivamente, e por *Geotrichum candidum*, foram em média 272,78 e 95,70%, respectivamente.
- Analisando as varáveis: concentração de 2-propanol e concentração de fosfato de potássio, por um planejamento composto central e da técnica de superfície de resposta proporcionaram um fator de purificação de 12,13 e 11,40 para a lipase produzida por *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*, respectivamente.
- Estes fatos mostram, que a avaliação conjunta das variáveis, tanto para produção quanto para purificação da lipase, pode tornar um processo promissor para aplicação industrial.

## **CAPÍTULO 6**

### **SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Estudar a produção de lipase em reator batelada com influência da agitação e aeração;
- Liofilizar a enzima purificada após aplicação do sistema aquoso bifásico;
- Aplicar a enzima produzida e purificada em reações de transesterificação, como por exemplo, na produção de biodiesel pela rota enzimática.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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**, New York, v. 31, 968 – 975, 2002.
2. AGUILAR, C. N.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; RADO-BARRAGÁN, P. A.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R. MARTÍNEZ-HERNANDEZ, J. L.; CONTRERASESQUIVEL, J. C. Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. **American journal of biochemistry and biotechnology**, v. 4, p. 354 – 366, 2008.
3. ALBERTSSON, P. A. Partition of cell particles and macromolecules. **Wiley Interscience**, New York, USA, 1986.
4. ALVES, J. G. L. F. ; CHUMPITAZ, L. D. A.; SILVA, L. H. M.; FRANCO, T. T. ; MEIRELLES, A. J. A. Partitioning of whey proteins, bovine serum albumin and porcine insulin in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B 1+2** v. 743, p. 235 – 239, 2000.
5. ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTYO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor sp.* for production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, 2002.
6. BARBOSA, J. M. P., **Purificação e caracterização de lipase de *Bacillus sp.* ITP-001**, Dissertação de mestrado, UNIT – Universidade Tiradentes, Aracaju, SE – Brasil, 2011.
7. BASSANI, G.; FUCIÑOS, P.; PICÓ, G.; FARRUGGIA, B. *Candida rugosa* lipase Lip1-polyethyleneglycol interaction and the relation with its partition in aqueous two-phase systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 532 – 537, 2010.
8. BECKER, P.; ABU-REESH, I.; MARKOSSIAN, S.; ANTRANIKIAN, G.; MARKE, H. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus sp.* IHI-91 o olive oil. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 48, p. 184 – 190, 1997.
9. BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Enhancement of lipase production during repeated batch culture using immobilized *Candida rugosa*. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 437 – 440, 1997.
10. BENJAMIN, S.; PANDEY, A. *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. **YEAST, Chichester**, v. 14, p. 1069 – 1087, 1998.

11. BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**, Ed. Interciênciac. Rio de Janeiro, 2008.
12. BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001.
13. BOUTROU, R.; GUÉGEN, M. Interest in *Geotrichum candidum* for cheese technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 1 – 20, 2005.
14. BURKERT, J.F de M. **Otimização das condições de produção da lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552**. Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas, SP. Brasil, 2003.
15. BUSTAMANTE, M.A.; VIRTO, M.; ARAMBURU, M.; BARRON, L. J. R.; PÉREZELORTONDO, F. J.; ALBISU, M.; RENOBALES, M. Lambrennet paste in ovine cheese (Idiazabal) manufacture. Proteolysis and relationship between analytical and sensory parameters, **International Dairy Journal**, v. 13, p. 547 – 557, 2003.
16. CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R.; GAMA, M.. **Engenharia enzimática**, 1<sup>a</sup> ed., Lisboa: Lidel, 2003.
17. CARDENAS, F.; CASTRO, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, J.V.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W.; ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. **Enzymes and Microbial Technology**, v. 28, p. 145 – 154, 2001.
18. CARVALHO, N. B. ; SOUZA, R. L. ; LIMA, A.S. ; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F.; SOARES, C. M. F. Sequential production of amylolytic and lipolytic enzymes by bacterium strain isolated from petroleum contaminated soil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2008.
19. CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; SANT'ANNA JR, G.L.; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v.4, 239– 247, 2000.
20. CASTILHO, B; PACHECO, Y.; AL-AZZAM, W.; GRIEBENOW, K.; DEVI, M.; FERRER, A.; BARLETTA, G. On the activity loss of hydrolases in organic solvents I. Rapid loss of activity of a variety of enzymes and formulations in a range of organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 35, p. 147 – 153, 2005.
21. CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146 – 156, 2004.

22. CHEN, X.D.; PATEL, K.C. Micro-organism inactivation during drying of small droplets or thin-layer slabs – A critical review of existing kinetics models and an appraisal of the drying rate dependent model. **Journal of Food Engineering**, v.82, 1–10, 2007.
23. COIMBRA, J. S. R.; GERALDO-ZUÑIGA, A. D.; MINIM, L. A.; MEIRELLES, A. J. A. Uso de sistema aquoso bifásico na extração líquido-líquido. **Cadernos didáticos**, 95. Viçosa: UFV, p. 43, 2003.
24. COSTA, V. E.U.; AMORIM, H. L. N. de. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v.22, Porto Alegre, Brasil, 1999.
25. DALMAU, E.; MONTESINOS, J.L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, 657–663, 2000.
26. DEIVE, F. J.; COSTAS, M.; LONGO, M. A. Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters, Dordrecht**, v. 25, p. 1403 – 1406, 2003.
27. DIAZ, J.C.M.; RODRIGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, 1042–1050, 2006.
28. DIB, J. C.; DUBE, M.; KELLY, C.; RINALDI, M. G.; PATTERSON, J. E. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a typing system for *Candida rugosa*: comparison of karyotype and restriction fragment length polymorphisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 1494 – 1496, 1996.
29. DZIEZAK, J.D. Enzymes: catalyses for food processes. **Food technology**, v. 45, p. 78 – 85, 1991.
30. ELLAIAH, P.; PRABHAKAR, T. T.; RAMAKRSHNA, B.; THAER TALEB, A.; ADINARAYANA,K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, India, v. 39, p. 525 – 528, 2004.
31. FADILOGLU, S.; ERKMEN, O. Effects of Carbon and Nitrogen Sources on Lipase Production by *Candida rugosa*. **Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences**. v.26, 249 – 254, 2002.
32. FARÍAS, C. M. M.; SOUZA, M.; SOUZA-MOTTA, C. M.; MAGALHÃES, O. M. C. Seleção de óleos vegetais para produção de lipases por culturas de *Geotrichum candidum*.

- Anais do I CONABIO – Congresso Nacional de Ciências Biológicas, Recife, PE – Brasil, 2012.
33. FEDATTO, L.M. **Caracterização de Proteases Extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira.** Dissertação de Mestrado. ESALQ/CENA-USP, Piracicaba, SP – Brasil, 2004.
34. FEITOSA, I. C. **Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa.** Dissertação de Mestrado. UNIT – Universidade Tiradentes. Aracaju, SE – Brasil, 2009.
35. FICKERS, P.; NICAUD, J. M.; GAILLARDIN, C.; DESTAIN, J.; THONART, P. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 742 – 749, 2004.
36. GANDRA, K. M.; BIANCHI, M. D.; GODOY, V. P.; QUEIROZ, F. P. C.; STEEL, C. J. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2008.
37. GARZA-MADRID, M.; RITO-PALOMARES, M.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; BENAVIDES, J. Potential of aqueous two-phase system constructed on flexible devices: human sérum albumin as proof of concept. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1082 – 1087, 2010.
38. GAUR, R.; ANSHU, G. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application, **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4796 – 4802, 2008.
39. GHALY, A.E.; DAVE, D.; BROOKS, M.S.; BUDGE, S. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, p. 54 – 76, 2010.
40. GINALSKA, G.; BANCERZ, R.; KORNILLOWICZ-KOWASLKA, T. A thermostable lipase produced by a newly isolated *Geotrichum* – like strain, R59. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 31, p. 177 – 182, 2004.
41. GODFREY & WEST. **Industrial Enzymology**, 2<sup>a</sup> ed., New York, 1996.
42. GONÇALVES, F. A. G. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, MG – Brasil, 2007.
43. GRABE, T. A.; TABOADA, M. E.; CARTÓN, A.; BOLADO, S. Liquid – liquid equilibrium of the Poly(ethylene glycol) + Nitrate + Water system at 298.15 K. **Journal of Chemistry Engineering Data**, v. 45, p. 182 – 184, 2000.

44. GREVE, A.; Kula, M. R. Phase diagrams of new aqueous phase systems composed of aliphatic alcohols, salts and water. **Fluid Phase Equilibria**. v. 62, p. 53 – 63, 1991.
45. GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 64, p. 763–781, 2004.
46. HADEBALL, W. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. **Acta Biotechnology**, v. 11, p. 159 – 167, 1991.
47. HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. In: **Bioquímica das Fermentações**, p.56, 1982.
48. HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED,A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006.
49. HAYALOGLU, A. A.; KIRBAG, S. Microbial quality and presence of moulds in Klufu cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 376 – 380, 2007.
50. JAEGER, K.E.; RANSAC, S.; DJISKSTRA, B.W.; COLSON, C.; HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbial. Rev.** v.15, p. 29 – 63, 1994.
51. JAEGER, K. E.; REETZ, M. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. **Tibtech**, v.16, p. 396 – 403, 1998.
52. JAEGER, K.E; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390 – 397, 2002.
53. JESUS, M.F.C.P.; BRANCO, R.N.; SANT'ANA JR., G.L.; FREIRE, D.M.G.; SILVA JR., J.G. *Penicillium restrictum* lipases: a comparative study and characterization of enzymes with different degrees of purity. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, 1999.
54. KAMBOUROVA, M., KIRILOVA, N., MANDEVA, R., DEREKOVA, A. Purification and properties of thermostable lipase from thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymes**, v. 22, p. 307 – 313, 2003.
55. KANWAR, L.; GOGOI, B. K.; GOSWAMI, P. Production of a *Pseudomonas* lipase in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. **Bioresource Technology**, v.84, p. 207–211, 2002.
56. KANWAR, S. S.; GHAZI, I. A.; CHIMI, S. S.; JOSHI, G. K.; RAO, G. V.; KAUSHAL, R. K.; GUPTA, R.; PUNJ, V. Purification and properties of a novel extra-cellular thermotolerant metallolipase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375 isolate. **Protein Expression and Purification**, v. 46, p. 421 – 428, 2006.
57. KIM, C. W.; RHA, C. Y.; **Physics and Chemistry of Liquids**, v. 38, p. 25, 2000.

58. KNOB, A.; TERRASAN, C.R.F.; CARMONA, E.C. Efeito das condições de cultivo e fontes de carbono na produção de xilanases por *Penicillium sclerotiorum*. **Anais. Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM.** Paraná, PR – Brasil, 2007.
59. KOBLITZ, M. G. B.; PASTORE, G. M. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus sp.*, Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 24(2), p. 287 – 292, 2004.
60. KOUTINAS, A.A.; WANG, R.; WEBB, C. Estimation of fungal growth in complex, heterogeneous culture. **Biochemical Engineering Journal**, v.14, p. 93 –100, 2003.
61. 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.
62. KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; BANERJEE, R. Statical optimization of culture conditions by response surfasse methodology for synthesis of lipase with *Enterobacter aerogenes*, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52 (6), p. 1349 – 1356, 2009.
63. LAKSHMI, B. S. et al. Effect of vegetable oils in the secretion of lipase from *Candida rugosa* (DSM 2031). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, p. 66 – 70, 1999.
64. LEE, K.; FOGLIA, T.A.; CHANG, K. Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 79, p. 191 – 195, 2002.
65. LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**, v.1, ed.2, São Paulo: Edgard Blücher Ltda, p. 262, 1993.
66. LI, C.Y.; CHENG, C.Y.; CHEN, T.L. Production of *Acinetobacter radioresintens* lipase using Tween 80 as the carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p. 258 – 263, 2001.
67. LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**, 2. reimpressão. São Paulo: E. Blücher, v. 3, 2007.
68. LIU, Z.; CHI, Z.; JING LI, L. W. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, 445 – 451, 2008.
69. LOTTI, M.; MONTICELLI, S.; MONTESINOS, J.L.; BROCCA, S.; VALERO, F.; LAFUENTE, J. Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. **Chemistry and physics of lipids**. v. 93, p. 143 – 148, 1998.

70. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265 – 275, 1951.
71. MA, B.; HU, M.; LI, S.; JIANG, Y.; LIU, Z. Liquid – liquid phase equilibrium in the ternary system Poly (ethylene glycol) + CS<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O. **Journal Chemistry Engineering Data**, v. 50, p. 792 – 795, 2005.
72. MACHADO, R. P., **Produção de etanol a partir de melaço de soja**. Dissertação Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul UFRS. Porto Alegre, 1999.
73. MAHADIK,N. D.; BASTAWDE, K. B.; PUNTAMBEKAR, U. S.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2031 – 2034, 2004.
74. MAIA, M.M.D.; MORAIS, M.M.C.; MORAIS JR., M.A.; MELO, E.H.M.; LIMA FILHO, J.L. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* Fs1. **Revista de Microbiologia**, v.30, 304 – 309, 1999.
75. MAIA, M.M.D.; HEASLEY, A.; MORAIS, M.M.C.; MELO, E.H.M.; MORAIS JR, M.A.; LEDINGHAM, W.M.; LIMA FILHO, J.L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**, v.76, 23 – 27, 2001.
76. MALDONADO, R. R. **Produção, purificação e caracterização de lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais**. Dissertação de Mestrado. UNICAMP – Universidade Federal de Campinas, Campinas, SP – Brasil, 2006.
77. MARCELINO, M.; BEUVIER, E.; GRAPPIN, R.; GUÉGUEN, M.; BENSON, D. R. Diversity of *Geotrichum candidum* strains isolated from traditional cheesemaking fabrications in France. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4752 – 4759, 2001.
78. MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biosurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos, **Química Nova**, v. 31, p. 1942 – 1947, 2008.
79. MATSUOKA, H.; MIURA, A.; HORI, K. Symbiotic effects of a lipase-secreting bacterium, *Burkholderia arboris* SL1B1, and a glycerol-assimilating yeast, *Candida cylindracea* SL1B2, on triacylglycerol degradation, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107(4), p. 401 – 408, 2009.

80. MEDVED'OVÁ, A.; LIPTÁKOVÁ, D.; HUDECOVÁ, A.; VALÍK, L. Quantification of the growth competition of lactic acid bacteria: a case of co-culture with *Geotrichum candidum* and *Staphylococcus aureus*. **Acta Chimica Slovaca**, v. 1, p. 192 – 207, 2008.
81. MISHIMA, K.; MATSUYAMA, K.; EZAWA, W.; TARUTA, Y.; TAKARABE, S.; NAGATINI, M.; J. Chromatography, B: **Analisis Technology Biomedical Life Science**. v. 711, p. 313, 1998.
82. MLADENOSKA, I.; DIMITROVSKI, A. – Lipase production by *Geotrichum candidum* – M2. **Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia**, v. 20, p. 39 – 43, 2001.
83. MONTESINOS, J.L.; OSBRADORS, N.; GORDILLO, M.A.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÀ, C. Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 59, p. 25 – 37, 1996.
84. MORAES, B. S.; VERONES, A. G.; KAMIMURA, E. S.; TOMMASO, G. **Produção de lipase de *Candida rugosa* utilizando soro de queijo**. FZEA – Departamento de Engenharia de Alimentos, USP, Pirassununga, SP, 2007.
85. NELSON, D. L.; COX, M. M.. **Lehninger princípios de bioquímica**. São Paulo, 2006.
86. OLIVEIRA, R. M. **Equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, sulfato de zinco, sulfato de cobre e citrato de sódio sob diferentes temperaturas**. Tese de Doutorado, UFV – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG – Brasil, 2006.
87. OOI, C. W.; TEY, B.T.; HII, S. L.; KAMAL, S. M. M.; LAN, J. C. W.; ARIFF, A.; LING, T. C. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/saltbased aqueous two-phase systems, **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1083 – 1087, 2009.
88. PALEKAR, A. A.; VASUDIVAN, P. T.; YAN, S. Purification of lipase: a review. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 18, n 3, p. 177 – 200, 2000.
89. PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v.77, p.149 – 162, 1999.
90. PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Plant lipases from latex: properties and industrial applications. **Química Nova**, v. 29, nº 1. São Paulo, 2006.
91. PASTORE, G.M.; COSTA, V.S.R.; KOBLITZ, M.G.B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de

- Rhizopus sp.* Ciência e Tecnologia de Alimentos, v..23, n.2, p. 135 – 140, Campinas, 2003.
92. PATEL, R.N. Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzymes Microbial Technology**, v. 31, p. 804 – 826, 2002.
93. PESSOA JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. 1<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole, 2005.
94. PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; COLOMBO, A. L.; KIBBLER, C.; NG, K. P.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A. *Candida Rugosa*, an Emerging Fungal Pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from de Artemis Disk Antifungal Surveillance Program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3578 – 3582, 2006.
95. PINHEIRO, T. L. F. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como micro-organismo**. Dissertação de Mestrado. Universidade Regional Integrada, Departamento de Ciências Agrárias, Erechim, RS – Brasil, 2006.
96. PINHEIRO, T. L. F.; LIPKE, N. R.; KEMPKA, A. P.; MENONCIN, S.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M.; FREIRE, D. M. G. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid state fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 2, p. 119 – 125, 2008.
97. PIZARRO, A. V. L. & PARK, E. Y. Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oil contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 38, p. 1077 – 1082, 2003.
98. RABELO, A. P. B.; TAMBOURGI, E. B.; PESSOA Jr., A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous system containing PEO-PPO-PEO block copolymers. **Journal of Chromatography B**, v. 807, p. 61 – 68, 2004.
99. RAWDKUEN, S.; PINTATHONG, P.; CHAIWUT, P.; BENJAKUL, S. The partitioning of protease from *Calotropis procera* latex by aqueous two-phase systems and its hydrolytic pattern on muscle proteins. **Food and Bioproducts Processing**, 2010.
100. RICHETTI, A. **Esterificação de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente**. Dissertação de Mestrado. UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia Química, Rio de Janeiro, RJ – Brasil, 2009.
101. RIGO, E.; NINOW, J. L.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, J. V.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.

- Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p. 1132 – 1137, 2010.
102. RODRIGUES, L. R., VENANCIO, A., TEIXEIRA, J. A. Recovery of the proteose peptone component 3 from cheese whey in Reppal PES 100/polyethylene glycol aqueous two-phase systems. **Biotechnology Letters**. v. 25: p. 651 – 655, 2003.
103. ROGERS, R. D.; WILLAUER, H. D.; GRIFFIN, S. T.; HUDDLESTON, J. G. Partitioning of small organic molecules in aqueous biphasic systems. **Journal of Chromatography B**, v. 711, p. 255 – 263, 1998.
104. ROMÃO, B. B. **Ethanol production from acidic hydrolysed of soybean molasses**. Master dissertation, Federal University of Uberlândia, 2011.
105. ROONEY, D.; WEATHERLEY, L.R. The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 947 – 953, 2001.
106. ROSA, D. R.; CAMAROTA, C. M.; FREIRE, D. M. G. Production and utilization of a new solid enzymatic preparation produced by *Penicillium restrictum* in activated sludge systems treating wastewater with high levels of oil and grease. **Environmental Engineering Science**, v. 23(5), p. 814 – 23, 2006.
107. ROSEVEAR, A.; KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. **Immobilized Enzymes and Cells**. Adam Hilger: Bristol and Philadelphia, cap. 5, 1987.
108. RÚA, M.S.; DIAZ-MAURIÑO, T.; FERNÁNDEZ, V.M.; OTERO, C.; BALLESTERO, A. Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindraceae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1156, p. 181 – 189, 1993.
109. SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil Mill effluent based médium using statistical experimental design. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, p. 66 – 73, 2011.
110. SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36 – 44, 2012.
111. SANROMAN, M.A.; COUTO, S.R. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291 – 302, 2006.
112. SATO, K.; SUDO, S. Small-scale solid-state fermentations, **Manual of industrial microbiology and biotechnology**, 2<sup>a</sup> ed., Washington DC, 1999.

113. 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. 339 – 247, 2003.
114. SCHAECHTER, M. **Desk Encyclopedia of Microbiology**, 2 ed., San Diego: Academic Press, p. 1276, 2009.
115. SELVAKUMAR, P.; LING, T. C.; WALKER, S.; LYDDIATT, A. A practical implementation and exploitation of ATPS for intensive processing of biological feedstock: A novel approach for heavily biological feedstock loaded ATPS. **Separation and Purification Technology**, 2010.
116. SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purificatrion, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627 – 662 , 2001.
117. SHU, C.; XU, C.; LIN, G. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. **Process Biochemistry**, Taiwan, v. 41, p. 734 – 738, 2006.
118. SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Qímica Nova**, v. 29, p. 1345 – 1351, 2006.
119. SILVA, F. B. **Ethanol production from enzymatically hydrolysed of soybean molasses**. Master dissertation, Federal University of Uberlândia, 2011.
120. SILVA, L. H. M., COIMBRA, J. S. R.; MEIRELLES, A. J. A. Equilibrium Phase Behavior of Poly(ethylene glycol) + Potassium Phosphate + Water Two-Phase Systems at Various pH and Temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 42, n. 2, p. 398 – 401, 1997.
121. SIQUEIRA, P. F. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. Master Dissertation, Federal University of Paraná/ Universities of Provence and of the Mediterranean, 2007.
122. SOARES, C.M.F. **Otimização por Planejamento Experimental da Imobilização de Lipase em Sílica de Porosidade Controlada na Presença de Estabilizantes**. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Campinas, SP. Brasil, 2000.
123. SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, 205 – 218, 2003.
124. SPIER, M.R. **Produção de Enzimas Amilolíticas Fúngicas A-Amilase e Amiloglucosidase por Fermentação no Estado Sólido**. Dissertação de Mestrado. UFPR, PR, Brasil, 2005.

125. SUN, S. Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solidstate fermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis, **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2607 – 2612, 2009.
126. TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase producing *Candida sp.* and production of lipase by fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 459 – 465, 2003.
127. TIANWEI T, QING H, QIANG L. Purification of glycyrrhizin from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch with ethanol/phosphate aqueous two phase system. **Biotechnology Letter**, v. 24, p. 1417 – 1420, 2002.
128. TOMMASO, G.; MORAES, B. S.; MACEDO, G. C.; SILVA, G. S.; KAMIMURA, E. S. Production of lipase from *Candida rugosa* using cheese whey through experimental design and surface response methodology. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, n. 8, p. 1473 – 1481, 2010.
129. TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 182 – 196, 2010.
130. TUMANG, T. R.; COSTA, É. S. da. Maldi-tofms aplicada à produção, purificação e caracterização de lipases de interesse biotecnológico. **XIV Seminário de Iniciação Científica**. PIBIC –PUC-RIO, 2006.
131. USA (2012). **Protein Precipitation**. University of Chicago. Disponível na Internet via: <http://sosnick.uchicago.edu/precipintro.html>. Arquivo capturado em 11 de novembro de 2012.
132. VARGAS, G. D. L. P.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; BENETI, S. C.; FREIRE, D. M. G.; LUCCIO, M. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 1, p. 47 – 54, 2007.
133. VIEIRA, G. A. B.; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; MELO, V. M. M.; GONZALO, G.; GOTOR-FERNANDEZ, V.; GOTOS, V. Chemoenzymatic synthesis of optically active Mugetanol isomers: use of lipases and oxidoreductases in fragrance chemistry, **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20(2), p. 214 – 219, 2009.
134. VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions, **Biotechnology Advances**, 25 (6), p. 515 – 536, 2007.

135. VULFSON, E. N.; WOOLLEY, P.; PETERSEN, S. B. **Lipases: their Structure, Biochemistry and Application.** Cambridge University Press, United Kingdom, p. 271 – 288, 1994.
136. WAZIRI, S. M.; ABU-SHARKH, B. F.; ALI, S. A. The effect of pH and salt concentration on the coexistence curves of aqueous two-phase systems containing a pH responsive copolymer and polyethylene glycol. **Fluid Phase Equilibrium**, v. 205, p. 275 – 290, 2003.
137. WOLSKI, E.; MENUSSI, E.; REMONATTO, D.; VARDANEGA, R.; ARBTER, F.; RIGO, E.; NINOW, J.; MAZUTTI, M. A.; LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D. 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, 2008.
138. YANG, X.; WANG, B.; CUI, F.; TAN, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2095 – 2103, 2005.
139. YANG, J.; GUO, D.; YAN, Y. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, p. 91 – 96, 2007.
140. YANG, L.; HUO, D.; HOU, C.; HE, K.; LV, F.; FA, H.; LUO, X. Purification of plantesterase in PEG 1000/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> aqueous two-phase system by a two-step extraction. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1664 – 1671, 2010.
141. YAN-MIN, L.; YAN-ZHAO, Y.; XI-DAN, Z.; CHUAN-BO, X. Bovine serum albumin partitioning in polyethylene glycol (PEG)/potassium citrate aqueous two-phase systems. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, p. 40 – 46, 2010.
142. ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; NASIRI, S. (Liquid + liquid) and (liquid + solid) equilibrium of aqueous two-phase systems containing poly ethylene glycol di-methyl ether 2000 and di-sodium hydrogen phosphate. **Journal of Chemistry Thermodynamics**, v. 42, p. 1071 – 1078, 2010.
143. ZAREVÚCKA, M.; KEJIK, Z.; SAMAN, D.; WIMMER, Z.; DEMNEVORÁ. Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 481 – 486, 2005.
144. ZUÑIGA, A. D. G.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A. Coeficientes de partição da α-lactoalbumina e β-lactoglobulina em sistemas aquosos bifásicos: Influência da massa molar do polímero, **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 3 (3), p. 149 – 155, 2001.

## APÊNDICE A

### DOSAGEM DE PROTEÍNA

A dosagem de proteína foi realizada pelo Método de Lowry (1951), utilizando-se os reagentes A e B e a solução AB.

**Reagente A:** 2 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  seco mais 0,02 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 100 mL de  $\text{NaOH}$  0,1 M

**Reagente B:** 0,5 g de  $\text{CuSO}_4$  mais 2 gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado em 100 mL de água destilada.

**Solução AB:** 50 mL de reagente A e 1 mL de reagente B, preparado imediatamente antes da dosagem.

Reagente de Folin: preparou-se uma solução 1 N e armazenou ao abrigo da luz. Solução padrão de soro de albumina bovina (BSA) 100 mg/L. Adicionou-se cuidadosamente 100 mg de BSA em 1000 mL para evitar a formação de bolhas. Esta solução foi conservada sob refrigeração.

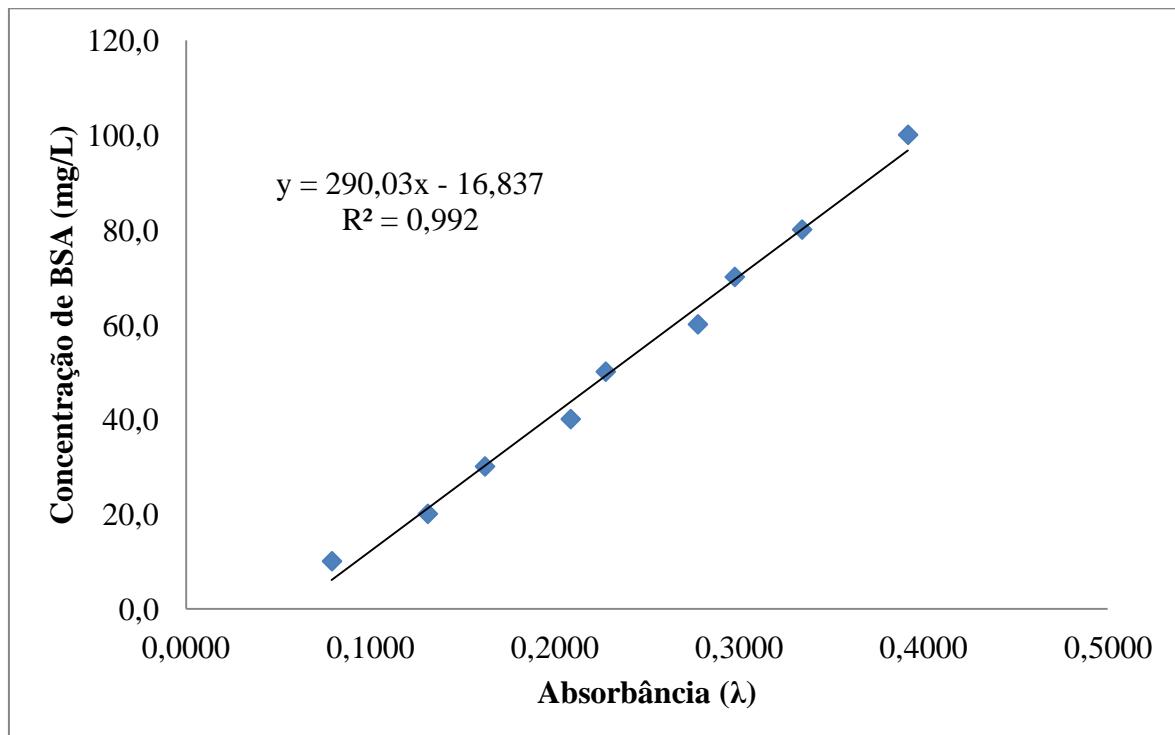
Para a dosagem de proteína fazia-se a diluição das amostras para que a absorbância situasse na faixa de 0,0 a 1,0. Amostras de 1,0 mL contendo a proteína a ser medida foram adicionadas a um frasco tipo penicilina cor âmbar no qual foram acrescentados 3 mL de solução AB, cobertos com parafilm, homogeneizados, protegidos da luz e mantidos desta forma por 10 minutos. Após este tempo adicionou-se 0,3 mL de reagente Folin 1 N e deixou por mais 30 minutos ao abrigo da luz. Ao final efetuou a medida da absorbância a 760 nm em espectrofotômetro, utilizando cubetas de vidro.

A leitura da absorbância foi convertida em concentração de proteína pela curva de calibração realizada anteriormente pelo mesmo procedimento, com medidas de absorbância em relação a concentrações de BSA na faixa de 0 a 100 mg/mL, que resultou em uma equação linear.

Os dados utilizados para determinação da curva padrão, bem como o gráfico e a equação da curva padrão obtida são apresentados na Tabela A.1 e na Figura A.1.

**Tabela A.1** – Dados obtidos para a curva padrão pelo Método de Lowry

Curva Padrão	
Absorbância (λ)	Concentração BSA (mg/L)
0,0790	10,0
0,1310	20,0
0,1620	30,0
0,2085	40,0
0,2275	50,0
0,2775	60,0
0,2975	70,0
0,3340	80,0
0,3915	100,0

**Figura A.1** – Curva padrão obtida para a dosagem de proteínas pelo Método de Lowry