



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MILENA MARTINS ANDRADE

**PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE
Botryosphaeria ribis EC-01 E APLICAÇÕES**

MILENA MARTINS ANDRADE

**PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE
Botryosphaeria ribis EC-01 E APLICAÇÕES**

Tese apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para obtenção do título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Dall’Antonia.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Aneli de Melo Barbosa Dekker.

Londrina
2013

**Catálogo Elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A553p Andrade, Milena Martins.

Produção e imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 e aplicações
/ Milena Martins Andrade. – Londrina, 2013.
212 f. : il.

Orientador: Luiz Henrique Dall' Antônia.

Dissertação (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Resíduos agro industriais – Teses. 2. Fermentação submersa – Teses. 3.
Propriedades físico-químicas – Teses. 4. Imobilização – Teses. I. Dall' Antônia, Luiz
Henrique. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas.
Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

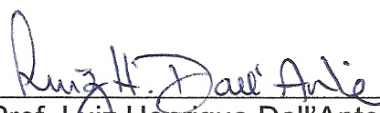
CDU 541.1

MILENA MARTINS ANDRADE

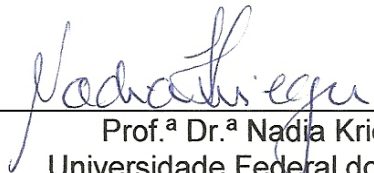
**PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Botryosphaeria ribis*
EC-01 E APLICAÇÕES**

Tese apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Luiz Henrique Dall'Antonia – orientador
Universidade Estadual de Londrina



Prof.^a Dr.^a Nadia Krieger
Universidade Federal do Paraná



Prof.^a Dr.^a Cristina Giatti Marques de Souza
Universidade Estadual de Maringá



Prof.^a Dr.^a Christiana Andrade Pessoa
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof.^a Dr.^a Ellen Julcileia Romão Sartori Braz
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 5 de agosto de 2013.

Ao meu pai Oswaldo (*in memoriam*), inspiração, primeiro mestre

À minha mãe Lenira, admiração e consideração

Ao Ian, filho amado, alegria de meus dias

Ao Igor, cúmplice e amigo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia, pela atenção despendida durante todo o trabalho, aprendizado e por ter aceito orientar um trabalho já em curso.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa Dekker, idealizadora deste trabalho, que mesmo distante esteve presente me auxiliando nos desafios da pesquisa. Meu agradecimento pelos ensinamentos, carinho e amizade.

À Profa. Dra. Maria Inês Rezende por tantas sugestões, estímulos e amizade.

Ao Prof. Dr. Robert Dekker por todas as contribuições neste trabalho.

À Profa. Dra. Carmen Luisa Barbosa Guedes por ceder seu laboratório e também por vezes, seus alunos.

Ao técnico Nelson Janeiro Rodriguez do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina por toda ajuda concedida sempre com muita dedicação.

Ao técnico Osvaldo Capello do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM) da Universidade Estadual de Londrina pela obtenção das micrografias deste trabalho.

Ao químico Jurandir Pereira Pinto do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina pelas análises de Cromatografia Gasosa.

À Josana Maria Messias pelo apoio inicial que foi fundamental, análises dos planejamentos, incentivo e, sobretudo a amizade.

Ao Matheus Rodrigues Bofinger por toda a assistência prestada durante três longos anos, sempre com muita dedicação e eficiência. Obrigada pelo apoio e por sua amizade.

Ao Bruno Henrique Oliveira pelo auxílio no desenvolvimento dos planejamentos e análises estatísticas.

Aos amigos do Laboratório de Fluorescência e Ressonância

Paramagnética Eletrônica (LAFLURPE) por toda ajuda, amizade e cumplicidade e, principalmente, por não se incomodarem com a agregada. Em especial quero agradecer à Talita, Flávia, Paulinha, Caren, Paula, Maria Eduarda, Fernanda, Grazielle, Jonathan Baumi, Bruna, Jhonatan Fiorio, sempre dispostos a me ajudar.

Aos estagiários e mestrandos que passaram pelo Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, pela amizade e companhia até mesmo nos finais de semana, em especial ao Paulo Marcelino.

Aos amigos do Laboratório de Eletroquímica e Materiais (LEMA) pela ajuda, apoio, companhia e amizade, principalmente à Adriana e Renata.

Aos meus amigos que perto ou longe, presentes ou ausentes sempre estiveram ao meu lado, torcendo, apoiando e vibrando com cada conquista: Álex Pavanelli, Ana Júlia Pigatto, Caryna Correr, Cristiane Mita, Daiane Ribeiro, José Evaristo, Juliana Gomes, Juliana Pezzoni, Juliana Senger, Lízia Yassumoto, Lidiane Klucinec, Michele Garcia e Luciana Cividatti, minha irmã científica por duas vezes.

À minha querida mãe, Lenira, por me acompanhar em meus sonhos, anseios, pelo apoio absoluto, carinho, amor e paciência. Ao meu irmão, Cesar, pelo carinho e apoio. Aos meus tios Ana e Antônio Carlos Quirino, sempre presentes em todas as etapas de minha vida.

À CAPES pela bolsa concedida.

À Fundação Araucária (Código Projeto: 15285 - Chamada Projeto: 14/2008), PROPPG-UEL (Projeto: 06246) pelo apoio financeiro.

Ao meu Sol e meu Solzinho pelo amor, carinho, apoio, paciência de todos os dias...sem vocês tudo seria mais complicado.

“Quanto mais eu estudo a natureza mais fico impressionado com a obra do Criador. Nas menores de suas criaturas Deus colocou propriedades extraordinárias...”

Louis Pasteur

ANDRADE, Milena Martins. **Produção e imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 e aplicações.** 2013. 212 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

Subprodutos do processamento de óleos vegetais como as tortas vegetais constituem substratos baratos para a fermentação microbiana de produção de lipases, que podem ser aplicadas na catálise de reações de transesterificação para a síntese de biodiesel. O objetivo deste trabalho foi produzir um catalisador estável e de baixo custo para aplicação na produção de biodiesel. Planejamentos estatísticos utilizando-se a Metodologia de Superfície de Resposta foram realizados com o intuito de avaliar a produção de lipase pelo fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 em condição de fermentação submersa. Após seleção das variáveis que mais influenciaram positivamente a produção de lipase, um planejamento fatorial 2^4 foi desenvolvido para avaliação das variáveis torta de soja, torta de mamona, glicerol e KH_2PO_4 . A torta de soja foi a variável que mais influenciou a produção de lipase, seguida pelo glicerol. Um novo planejamento 2^2 composto central acrescido de pontos axiais foi então desenvolvido para otimizar as concentrações de torta de soja e glicerol e obter os maiores títulos de lipase. Os valores preditivos para a produção de lipases nas condições otimizadas e nas três unidades avaliadas foram 72,81 U/mL, 111,8 U/mg e 4892 U/gss e os experimentais obtidos foram de $76,57 \pm 7,97$ U/mL, $138,7 \pm 0,34$ U/mg e $4820 \pm 248,8$ U/gss. A lipase produzida teve atividade ótima em pH 8 e 55°C, também foi estável entre 30 e 55°C e em pH de 1 a 10, e apresentou tolerância de 25, 10 e 50% (v/v) em metanol, etanol e glicerol, respectivamente. Os íons Mn^{2+} , Mg^{2+} e Ba^{2+} foram os ativadores mais significativos e os íons Fe^{3+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} foram os maiores inibidores da lipase livre de *B. ribis* EC-01. A lipase de *B. ribis* EC-01 hidrolisou todos os substratos testados, tendo afinidade pelo palmitato de *p*-nitrofenila. Dentre os suportes testados na imobilização desta lipase, o que proporcionou maior atividade específica em relação à enzima livre foi o Celite (1h a 5 °C) com 72,7 %, seguido do suporte quitosana em pó ativada com 0,25 % de glutaraldeído (59,5 %). A produção de biodiesel utilizando a lipase de *B. ribis* EC-01 em sua forma livre alcançou rendimento de 6 %, enquanto que a imobilizada em Celite, 36 %. A lipase imobilizada em Celite teve atividade ótima em pH 8 e 55 °C e foi estável em temperaturas de 40 a 55°C e também estável nos solventes metanol, *t*-butanol, glicerol e hexano em concentrações de 50, 100, 50 e 100 % (v/v), respectivamente. A lipase imobilizada em Celite apresentou constante de desativação térmica (k_d) menor que de sua forma livre. Na temperatura de 55 °C, esta lipase imobilizada dobrou o seu tempo de meia vida ($t_{1/2}$) em relação à livre e a 45 °C o tempo de meia vida passou de 28 dias para 412 dias com a imobilização. A forma imobilizada da lipase de *B. ribis* EC-01 também foi capaz de hidrolisar os substratos testados sendo que a sua maior afinidade foi com o palmitato de *p*-nitrofenila. Esta lipase imobilizada em pasta de carbono também foi avaliada para potencial aplicação em biossensores. Portanto, o uso de tortas vegetais como a torta de soja é viável para a produção de lipases em condição de fermentação submersa, produzindo um catalisador estável, inclusive após a sua imobilização, sendo promissor para aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Resíduos agro industriais. Fermentação submersa. Propriedades físico-químicas. Imobilização. Transesterificação.

ANDRADE, Milena Martins. **Production and immobilization of *Botryosphaeria ribis* EC-01 lipase and applications.** 2013. 212p. Thesis (Doctorate in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

By-products from processing vegetable oils such as oil-seed meals constitute cheap fermentation substrates for microbial production of lipases that can be applied to catalyze transesterification reactions for the synthesis of biodiesel. A factorial 2^4 statistical design was developed using the response surface methodology to evaluate lipase production by the ascomycete, *Botryosphaeria ribis* EC-01 under submerged fermentation by examining the influence of the concentrations of soybean and castor bean meals as well as glycerol and KH_2PO_4 . Soybean meal was the variable most influencing lipase production followed by glycerol. A new central composite factorial 2^2 design was then developed that added two axial points to optimize the concentrations of soybean meal and glycerol to obtain the highest lipase titres. The predicted lipase titres under the optimal conditions and at three units evaluated were 72.81 U/mL, 111.8 U/mg and 4892 U/gds and the experimental data were 76.57 ± 7.97 U/mL, 138.7 ± 0.34 U/mg and 4820 ± 248.8 U/gds. The produced lipase has optimal activity at pH 8 and 55°C , and it was also stable between 30 and 55°C and pH 1-10, and showed tolerance of 25, 10 and 50% (v/v) in methanol, ethanol and glycerol, respectively. The ions Mn^{2+} , Mg^{2+} and Ba^{2+} were the most important activators and ions Fe^{3+} , Cu^{2+} and Hg^{2+} were the most inhibitors *B. ribis* EC-01 lipase. *B. ribis* EC-01 lipase hydrolyzed all substrates having high affinity for *p*-nitrophenyl palmitate. Among the supports tested in the immobilization of this lipase Celite (1h at 5°C) provided higher specific activity compared to the free enzyme, which was 72.7%, followed by chitosan powder support activated with 0.25% glutaraldehyde (59.5 %). The production of biodiesel using *B. ribis* EC-01 lipase in its free form has reached 6% yield, whereas immobilized on Celite, 36%. The immobilized lipase on Celite has optimum activity at pH 8 and 55°C and it was stable at temperatures between 40 to 55°C , and also stable in solvents methanol, *t*-butanol, glycerol and hexane at concentrations of 50, 100, 50 and 100% (v/v), respectively. The lipase immobilized on Celite showed constant thermal deactivation (k_d) smaller than its free form. At the temperature of 55°C this lipase doubled its half-life ($t_{1/2}$) compared to free form and at 45°C the half-life increased from 28 days to 412 days with immobilization. The immobilized form of *B. ribis* EC-01 lipase was also able to hydrolyze the substrates while its high-affinity was for *p*-nitrophenyl palmitate. This lipase was also evaluated for potential application in biosensors immobilized on the carbon paste. Therefore, the use of vegetable pies like soybean cake is feasible for lipase production in submerged condition, producing a stable catalyst even after their immobilization being promising for biotechnological applications.

Keywords: Agro industrial residues. Submerged fermentation. Physico-chemical properties. Immobilization. Transesterification.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Ação catalítica das lipases. Um triacilglicerol pode ser hidrolisado a glicerol e ácidos graxos, ou o reverso (síntese) que combina glicerol e ácidos graxos para formar triacilgliceróis..... | 28 |
| Figura 2 – Reações catalisadas por lipases..... | 29 |
| Figura 3 – Diagrama esquemático da estrutura de dobra α/β hidrolase. As α hélices estão apresentadas como cilindros vermelhos, as fitas β como setas azuis e os três resíduos pertencentes ao sítio ativo são mostrados como círculos verdes. | 30 |
| Figura 4 – Mecanismo de hidrólise de um triacilglicerol por lipases..... | 31 |
| Figura 5 – Simulação do movimento da tampa da lipase de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a) na forma aberta revelando seu sítio ativo e b) forma fechada. O sítio ativo esta representado em amarelo e as tampas em azul e vermelho. | 32 |
| Figura 6 – Produção de biodiesel por transesterificação..... | 42 |
| Figura 7 – Mecanismo de catálise das lipases na transesterificação..... | 44 |
| Figura 8 – Métodos de imobilização de enzimas..... | 47 |
| Figura 9 – Propriedades da enzima e do suporte que determinam as propriedades da enzima imobilizada..... | 49 |
| Figura 10 – <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 crescido em VGA (Vogel-Glucose-Agar) após 5 dias de cultivo a 28 ± 2 °C..... | 61 |
| Figura 11 – Esquema da produção e separação da lipase produzida por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01..... | 62 |
| Figura 12 – Esquema geral da imobilização da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01..... | 70 |
| Figura 13 – Produção das esferas de quitosana pelo gotejamento da solução..... | 72 |
| Figura 14 – Esferas de quitosana produzidas..... | 72 |
| Figura 15 – Sistema de refluxo utilizado na produção de biodiesel com a lipase livre de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01..... | 78 |

| | |
|--|-----|
| Figura 16 – Produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 utilizando concentrações crescentes de torta de soja como substrato em a) U/mL; b) U/gss e c) U/mg ¹ | 84 |
| Figura 17 – Comparação da produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em torta de soja com adição de diferentes aminoácidos em (a) U/mL,(b) U/gss e (c) U/mg ¹ | 86 |
| Figura 18 – Influência das combinações das tortas de soja e mamona na produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 ¹ | 88 |
| Figura 19 – Influência da adição de glicerol-PA e GR à combinação das tortas de soja e mamona (3:1) na produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 ¹ | 89 |
| Figura 20 – Espectro de infravermelho do glicerol residual (GR) utilizado para a produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 | 90 |
| Figura 21 – Superfície de resposta para a produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 – Tratamento I (atividade em U/gss) | 93 |
| Figura 22 – Superfície de resposta para a produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 – Tratamento II (atividade em U/mL) | 95 |
| Figura 23 – Superfície de resposta para a produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 – Tratamento II (atividade em U/mg) | 96 |
| Figura 24 – Superfície de resposta para a produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 – Tratamento II (atividade em U/gss)..... | 97 |
| Figura 25 – Efeito do pH na atividade da lipase livre de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01. A atividade foi determinada em pH 8 na condição padrão descrita no item 4.2.4..... | 100 |
| Figura 26 – Efeito da temperatura na atividade da lipase livre de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01. A atividade foi determinada na condição padrão descrita no item 4.2.4 variando-se as temperaturas..... | 102 |
| Figura 27 – Estabilidade da lipase livre de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em diferentes temperaturas. O efeito da temperatura na estabilidade da lipase foi estudado medindo-se a atividade residual após o tempo de incubação em temperaturas variando | |

| | | |
|------------------|---|-----|
| | de 30 a 80 °C. A atividade está expressa como porcentagem da atividade determinada a 55 °C na condição padrão (item 4.2.4)..... | 103 |
| Figura 28 | - Gráficos de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk que mostram a tendência hipérbolo retangular característico de Michaelis-Menten e suas transformações lineares do a) acetato, b) butirato, c) caproato, d) caprato, e) palmitato e f) estearato de <i>p</i> -nitrofenila. | 109 |
| Figura 29 | - Imobilização da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 nos suportes GAC-LB (COCO) E GAC-LC (MADEIRA) a 5°C..... | 113 |
| Figura 30 | - Imobilização da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 nos suportes GAC-LB (COCO) E GAC-LC (MADEIRA) a 25°C..... | 113 |
| Figura 31 | - Cinética de imobilização da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em quitosana em esferas ativadas com (a) 1 %, (b) 3 % e (c) 5 % (v/v) de glutaraldeído (GA). Atividade e proteína residual no sobrenadante. | 117 |
| Figura 32 | - Estabilidade térmica da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em carvão ativado de coco (a) sem agente funcional; (b) ativado com glutaraldeído e (c) funcionalizado com EDC e glutaraldeído, durante 96 h a 40, 45, 50 e 55 °C. | 123 |
| Figura 33 | - Estabilidade térmica da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em Celite durante 96 h nas temperaturas de 40, 45, 50 e 55 °C. A atividade foi determinada na condição padrão descrita no item 4.2.4..... | 124 |
| Figura 34 | - Estabilidade térmica da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em quitosana em esferas (QE) ativada com (a) glutaraldeído (GA) e (b) EDC e glutaraldeído durante 96 h nas temperaturas de 40, 45, 50 e 55 °C. | 125 |
| Figura 35 | - Estabilidade térmica da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em quitosana em pó (QP) ativada com (a) 0,25 % (v/v) de glutaraldeído; (b) 3 % (v/v) de glutaraldeído e (c) EDC e glutaraldeído durante 96 h nas temperaturas de 40, 45, 50 e 55 °C | 126 |
| Figura 36 | - Comparação das estabilidades térmica da enzima livre e imobilizada em Celite a 40, 45, 50 e 55 °C 1 | 127 |

| | |
|--|-----|
| Figura 37 – Estabilidade da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em diversos suportes em metanol a 10, 25, 50 e 100 % (v/v) | 128 |
| Figura 38 – Estabilidade da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em diversos suportes em etanol a 10, 25, 50 e 100 % (v/v) | 129 |
| Figura 39 – Estabilidade da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em diversos suportes em <i>t</i> -butanol a 10, 25, 50 e 100 % (v/v) | 130 |
| Figura 40 – Estabilidade da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em diversos suportes em água, glicerina (50 %, v/v) e hexano (99,3 %, v/v) | 131 |
| Figura 41 – Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura do carvão ativado de coco (a) e (b) ¹ antes e (c) e (d) ¹ depois da imobilização da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01..... | 133 |
| Figura 42 – Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura do Celite (a) e (b) ¹ antes e (c), (d) e (e) ¹ depois da imobilização da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 | 134 |
| Figura 43 – Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura das esferas de quitosana (a), (b) ¹ e (c) ² sem ativação (d), (e) ³ e (f) ⁴ ativadas com EDC e glutaraldeído e (g), (h) ⁵ e (i) ⁴ depois da imobilização da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01..... | 135 |
| Figura 44 – Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura da quitosana em pó (a), (b) ¹ e (c) ² sem ativação (d) e (e) ³ ativadas com glutaraldeído e (f) e (g) ³ depois da imobilização da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 | 136 |
| Figura 45 – Espectros de infravermelho da lipase livre e do suporte Carvão Ativado de Coco antes e após a imobilização..... | 137 |
| Figura 46 – Espectros de infravermelho da lipase livre e do suporte Celite antes e após a imobilização | 138 |
| Figura 47 – Espectros de infravermelho do suporte quitosana em esferas modificada com EDC e glutaraldeído antes e após a imobilização | 139 |

| | |
|--|-----|
| Figura 48 – Espectros de infravermelho do suporte quitosana em pó modificada com glutaraldeído antes e após a imobilização | 140 |
| Figura 49 – Espectros de infravermelho do (a) padrão de biodiesel e (b) produto obtido com a catálise enzimática | 142 |
| Figura 50 – Efeito das variáveis independentes e de suas interações no rendimento em éster (%) utilizando a lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em quitosana em esferas representado no diagrama de Pareto..... | 146 |
| Figura 51 – Efeito das variáveis e de suas interações no rendimento em éster (%) utilizando a lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em quitosana em pó representado no diagrama de Pareto..... | 147 |
| Figura 52 – Diagramas de contorno gerados no planejamento fatorial 2 ³ para a produção de ésteres utilizando a lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em Celite | 149 |
| Figura 53 – Cromatograma obtido com o (a) padrão de biodiesel e (b) produto da catálise enzimática utilizando a lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em Celite | 151 |
| Figura 54 – Espectro de infravermelho obtidos com (a) padrão de biodiesel e (b) produto obtido com a lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em Celite. | 152 |
| Figura 55 – Efeito da temperatura na atividade da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em Celite. A atividade foi determinada na condição padrão descrita no item 4.2.4..... | 153 |
| Figura 56 – Efeito do pH na atividade da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em Celite. A atividade foi determinada em pH 8 na condição padrão descrita no item 4.2.4..... | 154 |
| Figura 57 – Curvas de determinação da constante de desativação térmica (kd) em diferentes temperaturas para a) enzima livre e b) enzima imobilizada em Celite..... | 156 |
| Figura 58 – Voltametria cíclica obtida para o eletrodo de pasta de carbono modificado com 200 µL de lipase em concentrações crescentes de palmitato de <i>p</i> -nitrofenila (<i>p</i> NPP). Eletrólito de suporte: | |

| | | |
|------------------|---|-----|
| | tampão fosfato pH 8 0,05 molL ⁻¹ com Triton X-100 (0,4 %, v/v) . v = 50 mV s ⁻¹ | 159 |
| Figura 59 | – Voltametria cíclica obtida para o eletrodo de pasta de carbono (EPC) modificado com 400 µL de lipase em concentrações crescentes de palmitato de <i>p</i> -nitrofenila. Eletrólito de suporte: tampão fosfato pH 8 0,05 molL ⁻¹ com Triton X-100 (0,4 %, v/v) . v = 50 mV s ⁻¹ | 160 |
| Figura 60 | – Voltametria cíclica obtida para o eletrodo de pasta de carbono (EPC) modificado com 400 µL de lipase em concentrações crescentes de óleo de soja. Eletrólito de suporte: tampão fosfato pH 8 0,05 molL ⁻¹ com Triton X-100 (0,4 %, v/v) . v = 50 mV s ⁻¹ | 161 |
| Figura 61 | – Voltametria cíclica obtida para o eletrodo de pasta de carbono (EPC) modificada com 200 µL de lipase em concentrações crescentes de azeite de oliva. Eletrólito de suporte: tampão fosfato pH 8 0,05 molL ⁻¹ com Triton X-100 (0,4 %, v/v) . v = 50 mV s ⁻¹ | 162 |
| Figura 62 | – Voltametria cíclica obtida para o eletrodo de pasta de carbono (EPC) modificado com 200 µL de lipase em misturas de óleo e azeite de oliva. Eletrólito de suporte: tampão fosfato pH 8 0,05 molL ⁻¹ com Triton X-100 (0,4 %, v/v) . v = 50 mV s ⁻¹ | 163 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|--------------------|---|----|
| Tabela 1 – | Torta de soja como substrato para produção de lipases por fermentação submersa | 35 |
| Tabela 2 – | Propriedades físico-químicas das lipases fúngicas produzidas por fermentação submersa | 38 |
| Tabela 3 – | Sistemas biocatalíticos de produção de biodiesel..... | 53 |
| Tabela 4 – | Meio BDA (Batata Dextrose Agar) | 60 |
| Tabela 5 – | Meio mínimo de saís de Vogel* | 60 |
| Tabela 6 – | Meio VGA (Vogel, Glucose e Ágar)..... | 60 |
| Tabela 7 – | Níveis de variação para os fatores do planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central para avaliação da produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 | 64 |
| Tabela 8 – | Níveis de variação para os fatores do planejamento fatorial 2^2 adicionado de pontos axiais e centrais para avaliação da produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 | 64 |
| Tabela 9 – | Suportes e métodos utilizados na imobilização da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01. | 69 |
| Tabela 10 – | Níveis de variação para os fatores dos planejamentos fatoriais 2^3 com triplicata no ponto central para avaliação da produção de biodiesel pela lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em quitosana em esferas e em pó | 79 |
| Tabela 11 – | Níveis de variação para os fatores do planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central para avaliação da produção de biodiesel pela lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em Celite | 80 |
| Tabela 12 – | Composição centesimal (g/100 g) das tortas de resíduos agroindustriais..... | 85 |
| Tabela 13 – | Influência das fontes de fosfato na produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 ¹ | 88 |
| Tabela 14 – | Planejamento fatorial para avaliação das variáveis torta de soja e mamona, glicerol PA e fosfato monobásico na produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 e as respostas obtidas (atividades enzimáticas)..... | 92 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Tabela 15 – | Planejamento fatorial para avaliar os efeitos da torta de soja e glicerol PA na produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 e as respostas obtidas (atividades de lipase)..... | 94 |
| Tabela 16 – | Análise de variância (ANOVA) para o planejamento fatorial 2 ² para a produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 ($p \leq 0,05$)..... | 97 |
| Tabela 17 – | Comparação dos resultados experimentais com os preditivos calculados pelo modelo matemático na produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01. | 98 |
| Tabela 18 – | Comparação da produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 por fermentação submersa e o custo unitário (\$US) para produzir lipase de quatro meios nutrientes diferentes..... | 99 |
| Tabela 19 – | Estabilidade da lipase livre de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 incubada em diferentes tampões e água destilada durante 1 h a 30 °C. | 101 |
| Tabela 20 – | Estabilidade da lipase livre de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 incubada em diferentes surfactantes. A atividade residual foi determinada na condição padrão descrita no item 4.2.4..... | 104 |
| Tabela 21 – | Influência de cátions metálicos na atividade da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01. A atividade residual determinada na condição padrão comparada ao controle ¹ | 106 |
| Tabela 22 – | Influência de diferentes solventes na atividade da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01. A atividade residual foi determinada na condição padrão..... | 107 |
| Tabela 23 – | Valores de K_M aparente e $V_{m\acute{a}x}$ para a lipase livre de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 | 108 |
| Tabela 24 – | Propriedades do Carvão ativado de coco (GAC-LB) e madeira (GAC-LC) Crosscarbo 12 x 40 (Cross Filter Brasil Ltda.) fornecidas pelo fabricante | 112 |
| Tabela 25 – | Parâmetros determinados para a imobilização da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em carvão ativado de coco..... | 115 |
| Tabela 26 – | Parâmetros determinados para a imobilização da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em Celite | 115 |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Tabela 27 – | Parâmetros determinados para a imobilização da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em quitosana em esferas e em pó | 118 |
| Tabela 28 – | Atividades da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada nos diversos suportes | 121 |
| Tabela 29 – | Caracterização dos constituintes do padrão de biodiesel (BQ) e produto obtido com a lipase livre de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 (BE) por espectroscopia de absorção no infravermelho | 141 |
| Tabela 30 – | Planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central para a produção de biodiesel utilizando a lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em quitosana em esferas (QE) e quitosana em pó (QP)..... | 144 |
| Tabela 31 – | Estimativa dos efeitos para o rendimento em éster (%) utilizando a lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em esferas de quitosana..... | 145 |
| Tabela 32 – | Estimativa dos efeitos para o rendimento em éster (%) utilizando lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em quitosana em pó..... | 147 |
| Tabela 33 – | Planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central para a produção de biodiesel utilizando a lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em Celite | 148 |
| Tabela 34 – | Análise de variância (ANOVA) para o planejamento factorial 2^3 para a produção de ésteres utilizando a lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em Celite. | 150 |
| Tabela 35 – | K_m aparente e V_{max} da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em Celite | 154 |
| Tabela 36 – | Comparação entre as constantes de desativação térmica e tempos de meia vida das lipases livre de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 e imobilizada em Celite em 96 h em temperaturas de 40 a 55 °C | 157 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------------------|---|
| AGL | Ácidos Graxos Livres |
| ANP | Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis |
| BDA | Batata Dextrose Agar |
| BE | Biodiesel Enzimático |
| BQ | Biodiesel Químico |
| CAC | Carvão Ativado de Coco |
| CAM | Carvão Ativado de Madeira |
| CAPES | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior |
| CCD | Cromatografia Camada Delgada |
| CG | Cromatografia Gasosa |
| CNPq | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| EB | Extrato Bruto de lipases |
| EDC | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida |
| EPC | Eletrodo de Pasta de Carbono |
| EPC/lípase | Eletrodo de Pasta de Carbono com lipase |
| EPS | Exopolissacarídeo |
| FES | Fermentação em Estado Sólido |
| FSub | Fermentação Submersa |
| GA | Glutaraldeído |
| Glicerol-PA | Glicerol de grau analítico |
| Glicerol residual-GR | Glicerol Residual |
| IV | Espectroscopia de absorção no infravermelho |
| MM | Meio Mínimo |
| MMSV | Meio Mínimo de Sais de Vogel |
| MSR | Metodologia de Superfície de Resposta |
| pNPP | Palmitato de <i>p</i> -nitrofenila |
| pNP | <i>p</i> -nitrofenol |
| QE | Quitosana em Esferas |
| QP | Quitosana em Pó |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio |
| USDA | United States Department of Agriculture |
| VGA | Vogel Glucose Agar |

SUMARIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 24 |
| 2 | OBJETIVOS | 26 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 26 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 26 |
| 2.2.1 | Produzir Lipase Por Botryosphaeria Ribis EC-01 Utilizando a Torta de Soja por Fermentação Submersa Adicionando Somente Água Destilada; | 26 |
| 2.2.2 | Pré-Selecionar as Variáveis que Influenciam a Síntese de Lipase por B. Ribis EC-01 Cultivado em Água Destilada e Torta de Soja (Concentração de Torta de Soja, Adição de Aminoácidos, Adição de Fonte de Fosfato, Adição de Torta de Mamona e Glicerol); | 26 |
| 2.2.3 | Otimizar a Produção da Enzima por Planejamento Fatorial e Análise por Superfície de Resposta; | 26 |
| 2.2.4 | Determinar as Propriedades Cinéticas e Físico-Químicas do Extrato Bruto da Lipase;..... | 26 |
| 2.2.5 | Selecionar Suportes para Imobilizar a Lipase de B. Ribis EC-01 para Aplicação na Síntese de Biodiesel; | 26 |
| 2.2.6 | Caracterizar os Suportes Antes e Após a Imobilização Pelas Técnicas de Espectroscopia de Infravermelho e Microscopia Eletrônica de Varredura; | 26 |
| 2.2.7 | Usar a Lipase Livre e Imobilizada na Produção de Biodiesel e Comparar os Rendimentos das Reações de Transesterificação..... | 26 |
| 2.2.8 | Determinar as Propriedades Cinéticas e Físico-Químicas da Lipase Imobilizada no Melhor Suporte e Comparar com as suas Propriedades com as da Lipase Livre; | 26 |
| 2.2.9 | Testar a Lipase Imobilizada de B. Ribis EC-01 na Produção de Eletrodos Modificados de Pasta de Carbono | 26 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 27 |
| 3.1 | LIPASES: DEFINIÇÃO, ASPECTOS ESTRUTURAIS E MECANISMOS DE AÇÃO..... | 27 |
| 3.2 | PRODUÇÃO DE LIPASES..... | 33 |
| 3.2.1 | Botryosphaeria Ribis EC-01 como Produtor de Lipase | 31 |
| 3.2.2 | Resíduos Agroindustriais como Substratos para Produção de Lipases | 35 |
| 3.3 | PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS LIPASES FÚNGICAS | 36 |
| 3.3.1 | Influência da Temperatura, pH, Solventes e Outros..... | 36 |
| 3.4 | APLICAÇÕES DAS LIPASES | 40 |
| 3.4.1 | Biodiesel..... | 41 |
| 3.4.2 | Imobilização de Enzimas..... | 46 |
| 3.4.2.1 | Materiais para imobilização de lipases..... | 50 |
| 3.4.3 | Biossensores..... | 56 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 59 |
| 4.1 | MATERIAIS | 59 |
| 4.1.1 | Tortas Vegetais | 59 |
| 4.1.2 | Glicerol | 59 |
| 4.1.3 | Suportes e Ativadores | 59 |
| 4.1.4 | Substratos | 59 |
| 4.1.5 | Biodiesel Padrão | 60 |
| 4.1.6 | Meios de Cultivo | 60 |
| 4.2 | METODOLOGIA EXPERIMENTAL | 61 |
| 4.2.1 | Micro-organismo e Cultivo..... | 61 |
| 4.2.2 | Produção de Lipase por Botryosphaeria ribis EC-01..... | 62 |
| 4.2.2.1 | Efeito da concentração de torta de soja | 62 |
| 4.2.2.2 | Efeito da adição de aminoácidos..... | 63 |
| 4.2.2.3 | Efeito das fontes de fosfato..... | 63 |
| 4.2.2.4 | Efeito das combinações das tortas de soja e mamona e adição de glicerol..... | 63 |
| 4.2.2.5 | Planejamento fatorial e análise por metodologia superfície de resposta (MSR) para a produção de lipases por Botryosphaeria ribis EC-01..... | 63 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 4.2.2.5.1 | <i>Tratamento I</i> | 63 |
| 4.2.2.5.2 | <i>Tratamento II</i> | 64 |
| 4.2.3 | Determinação da Concentração de Proteínas..... | 65 |
| 4.2.4 | Determinação da Atividade de Lipase Livre e Imobilizada | 65 |
| 4.2.5 | Determinação de Parâmetros Físico-Químicos e Cinéticos da Lipase Livre de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 | 67 |
| 4.2.5.1 | Temperatura e pH ótimos da lipase livre..... | 67 |
| 4.2.5.2 | Estabilidade térmica e em diferentes pH da lipase livre | 67 |
| 4.2.5.3 | Efeito de sais metálicos, detergentes e solventes orgânicos na lipase livre | 68 |
| 4.2.5.4 | Parâmetros cinéticos da lipase livre | 68 |
| 4.2.6 | Imobilização da Lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 | 69 |
| 4.2.6.1 | Seleção do carvão ativado de coco e madeira..... | 70 |
| 4.2.6.2 | Imobilização da lipase em Celite | 71 |
| 4.2.6.3 | Imobilização da lipase em quitosana..... | 71 |
| 4.2.6.3.1 | <i>Produção das esferas de quitosana</i> | 71 |
| 4.2.6.3.2 | <i>Funcionalização e imobilização da quitosana em esferas e em pó com glutaraldeído</i> | 72 |
| 4.2.6.3.3 | <i>Funcionalização e imobilização da quitosana em esferas e em pó com glutaraldeído e carbodiimida (EDC)</i> | 73 |
| 4.2.6.4 | Imobilização da lipase em carvão ativado de coco (CAC) | 74 |
| 4.2.6.5 | Equações utilizadas na imobilização da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01..... | 75 |
| 4.2.7 | Determinação de Parâmetros Físico-Químicos e Cinéticos da Lipase Imobilizada de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 | 75 |
| 4.2.7.1 | Estabilidade térmica da lipase imobilizada..... | 76 |
| 4.2.7.2 | Efeito de solventes orgânicos e água na lipase imobilizada | 76 |
| 4.2.7.3 | Temperatura e pH ótimos da lipase imobilizada em Celite | 76 |
| 4.2.7.4 | Parâmetros cinéticos da lipase imobilizada em Celite..... | 76 |
| 4.2.8 | Caracterização do Suporte de Imobilização..... | 77 |
| 4.2.8.1 | Microscopia eletrônica de varredura | 77 |
| 4.2.8.2 | Espectroscopia de absorção no infravermelho..... | 77 |
| 4.2.9 | Produção de Biodiesel pela Lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC- 01 | 77 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.2.9.1 | Lipase livre | 77 |
| 4.2.9.2 | Lipase imobilizada | 79 |
| 4.2.9.2.1 | <i>Lipase imobilizada em carvão ativo de coco</i> | 79 |
| 4.2.9.2.2 | <i>Lipase imobilizada em quitosana em esferas e em pó</i> | 79 |
| 4.2.9.2.3 | <i>Lipase imobilizada em Celite</i> | 80 |
| 4.2.9.3 | Análise dos ésteres de biodiesel por cromatografia em camada delgada | 81 |
| 4.2.9.4 | Análise dos ésteres do biodiesel por espectroscopia de absorção no infravermelho | 81 |
| 4.2.9.5 | Análise dos ésteres do biodiesel por cromatografia gasosa | 81 |
| 4.2.10 | Eletrodos de Pasta de Carbono Modificados com a Lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 | 82 |
| 4.2.10.1 | Medidas voltamétricas | 82 |
| 4.2.10.2 | Avaliação do substrato | 82 |
| 4.2.10.3 | Avaliação da concentração de lipase | 82 |
| 4.2.10.4 | Avaliação de misturas de substratos | 82 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 84 |
| 5.1 | PRODUÇÃO DE LIPASE POR <i>BOTRYOSPHAERIA RIBIS</i> EC-01 | 84 |
| 5.1.1 | Efeito da Concentração da Torta de Soja | 84 |
| 5.1.2 | Efeito da Adição de Aminoácidos à Torta de Soja | 85 |
| 5.1.3 | Efeito das Fontes de Fosfato Adicionadas à Torta de Soja | 87 |
| 5.1.4 | Efeito da Torta de Soja Combinada à Torta de Mamona e Adição de Glicerol | 88 |
| 5.1.5 | Otimização da Produção de Lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 Utilizando Metodologia de Superfície de Resposta | 91 |
| 5.2 | PARÂMETROS CINÉTICOS E FÍSICO-QUÍMICOS DA LIPASE LIVRE DE <i>BOTRYOSPHAERIA RIBIS</i> (EC-01) | 99 |
| 5.2.1 | Efeito do pH e Temperatura na Atividade e Estabilidade | 100 |
| 5.2.2 | Efeito de Surfactantes e Íons Metálicos na Estabilidade | 103 |
| 5.2.3 | Efeito de Solventes Orgânicos na Estabilidade | 107 |
| 5.2.4 | Determinação de K_M aparente e $V_{máx}$ | 108 |
| 5.3 | IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>BOTRYOSPHAERIA RIBIS</i> EC-01 | 110 |
| 5.3.1 | Seleção do Carvão Ativado Comercial | 111 |

| | | |
|--|---|------------|
| 5.3.2 | Imobilização em Carvão Ativado de Coco com agentes ativadores..... | 114 |
| 5.3.3 | Imobilização em Celite 545®..... | 115 |
| 5.3.4 | Imobilização em Quitosana..... | 116 |
| 5.4 | PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA LIPASE DE BOTRYOSPHERIA RIBIS EC-01 IMOBILIZADA..... | 122 |
| 5.4.1 | Estabilidade Térmica..... | 122 |
| 5.4.2 | Estabilidade em Solventes..... | 127 |
| 5.5 | CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE DE IMOBILIZAÇÃO..... | 132 |
| 5.5.1 | Microscopia Eletrônica de Varredura..... | 132 |
| 5.5.2 | Espectroscopia de Absorção no Infravermelho..... | 137 |
| 5.6 | APLICAÇÃO DA LIPASE LIVRE E IMOBILIZADA NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL..... | 140 |
| 5.6.1 | Produção de Biodiesel com a Lipase Livre..... | 140 |
| 5.6.2 | Produção de Biodiesel com a Lipase Imobilizada de Botryosphaeria ribis EC-01..... | 143 |
| 5.6.2.1 | Lipase imobilizada em carvão ativado de coco..... | 144 |
| 5.6.2.2 | Lipase imobilizada em quitosana em esferas e em pó..... | 144 |
| 5.6.2.3 | Lipase imobilizada em Celite..... | 148 |
| 5.7 | PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CINÉTICOS DA LIPASE IMOBILIZADA EM CELITE..... | 152 |
| 5.8 | PRODUÇÃO DE ELETRODOS MODIFICADOS COM A LIPASE DE BOTRYOSPHERIA RIBIS..... | 158 |
| CONCLUSÕES..... | | 165 |
| PERSPECTIVAS FUTURAS..... | | 167 |
| REFERÊNCIAS..... | | 168 |
| ANEXOS..... | | 189 |
| ANEXO A - Artigo publicado no periódico applied biochemistry and biotechnology..... | | 190 |

1 INTRODUÇÃO

A busca por inovações tecnológicas que possam substituir as reações químicas tradicionais tem aumentado nos últimos anos suportada pelo apelo de desenvolvimento de novos produtos e processos menos danosos ao meio ambiente.

O campo da Engenharia Bioquímica, área dentro da Engenharia Química tem sido explorada em diversos setores da economia, utilizando a biocatálise em indústrias de alimentos, detergentes, têxtil, no tratamento de resíduos, dentre outras aplicações. As enzimas são catalisadores biológicos de alta versatilidade, atuando em várias faixas de pH e temperatura. O uso de enzimas em substituição aos catalisadores químicos possui vantagens como sua biodegradabilidade, condições moderadas de reação, alta especificidade e eficiência, o que leva menor geração de produtos indesejáveis, entre outras. Apesar de tantas vantagens, sua aplicação industrial é limitada principalmente pelo custo destes biocatalisadores, o que torna difícil a competição com a produção química, otimizada e amplamente utilizada.

O uso de resíduos agroindustriais como a torta de soja, proveniente da extração do óleo de soja, pode reduzir e muito o custo de produção destas enzimas. Estes resíduos são excelentes fontes de proteína e carboidratos, nutrientes para cultivar micro-organismos e produzir enzimas. Além disso, são baratos e muito cultivados em países como o Brasil (RAMACHANDRAN et al., 2007).

A torta de soja domina o mercado das tortas vegetais com uma produção mundial de 177,8 milhões de toneladas entre os anos de 2010 e 2011. O Brasil produziu 27,9 milhões de toneladas, sendo o terceiro do “ranking” mundial (USDA, 2011).

As lipases (EC 3.1.1.3; triacilglicerol acilhidrolases) são enzimas de maior interesse biotecnológico que podem catalisar reações de interesterificação, transesterificação, aminólises, entre outras. Estas enzimas são amplamente distribuídas em plantas, animais e micro-organismos que incluem bactérias, fungos, leveduras e actinomicetos (JAEGER; EGGERT, 2002; SHARMA et al., 2011). As lipases fúngicas são versáteis em suas propriedades enzimáticas, possuem boa estabilidade e especificidade, o que as tornam muito atrativas para aplicações industriais (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). Estas enzimas são produzidas

principalmente por fermentação submersa (FSub) em um meio complexo influenciado pelo tipo e concentração das fontes de nitrogênio e carbono, pH do meio, temperatura, entre outras (SHARMA et al., 2001).

Fungos do gênero *Botryosphaeria* são endofíticos e secretam diferentes enzimas tais como lipases, lacases, pectinases, beta-1,3- glucanases, celulases, xilanases, amilases e inulinases (CUNHA et al., 2003). *Botryosphaeria ribis* EC-01 foi previamente selecionado como bom produtor de lipases entre nove isolados de *Botryosphaeria* spp. quando cultivado em diferentes óleos vegetais e glicerol por FSub (MESSIAS et al., 2009). *B. ribis* EC-01 também foi capaz de produzir lipase por fermentação em estado sólido (FES), utilizando como substratos, as tortas de milho, soja, mamona e azeitona, com destaque para as tortas de soja e mamona, somente com adição de água (COSTA, 2008).

Há uma gama de aplicações para as lipases, mas seu uso na conversão do óleo vegetal em metil, ou outro éster de álcool de cadeia curta, em uma única reação de transesterificação, tem sido uma área ativa de pesquisas recentes devido à necessidade de gerar um combustível econômico e “eco friendly”, que seja biodegradável, de baixa toxicidade e renovável. A transesterificação enzimática para a produção de biodiesel parece atraente e encorajadora desde que o glicerol, um subproduto, pode ser recuperado facilmente, o que facilita a separação do produto final. A biocatálise para a produção de biodiesel em comparação com a catálise química não necessita de tratamento de resíduo e a purificação dos ésteres formados, se necessária, é simples (BAJAJ et al., 2010; GHALY et al., 2010; VERDUGO et al., 2011). Porém a aplicação na produção de biodiesel pode ser desfavorecida, mais uma vez, pelo alto custo destas enzimas. Com o uso de resíduos agroindustriais, reduzindo o valor de produção e a possível imobilização da enzima pode ser a chave para produzir um biocatalisador mais econômico e efetivo.

Portanto este trabalho teve como objetivo produzir um biocatalisador estável pelo fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 por fermentação submersa utilizando resíduos agroindustriais, somente com adição de água, para aplicação na produção de biodiesel, utilizando o biocatalisador livre e também imobilizado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em fermentação submersa, utilizando como fonte de carbono a torta de soja, imobilizar a enzima em diversos suportes, comparar a produção de biodiesel em processo laboratorial pela lipase livre e imobilizada e também utilizar a enzima na produção de eletrodos modificados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 utilizando a torta de soja por fermentação submersa adicionando somente água destilada;
- Pré-selecionar as variáveis que influenciam a síntese de lipase por *B. ribis* EC-01 cultivado em água destilada e torta de soja (concentração de torta de soja, adição de aminoácidos, adição de fonte de fosfato, adição de torta de mamona e glicerol);
- Otimizar a produção da enzima por planejamento fatorial e análise por superfície de resposta;
- Determinar as propriedades cinéticas e físico-químicas do extrato bruto da lipase;
- Selecionar suportes para imobilizar a lipase de *B. ribis* EC-01 para aplicação na síntese de biodiesel;
- Caracterizar os suportes antes e após a imobilização pelas técnicas de espectroscopia de Infravermelho e Microscopia Eletrônica de Varredura;
- Usar a lipase livre e imobilizada na produção de biodiesel e comparar os rendimentos das reações de transesterificação.
- Determinar as propriedades cinéticas e físico-químicas da lipase imobilizada no melhor suporte e comparar com as suas propriedades com as da lipase livre;
- Testar a lipase imobilizada de *B. ribis* EC-01 na produção de eletrodos modificados de pasta de carbono

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

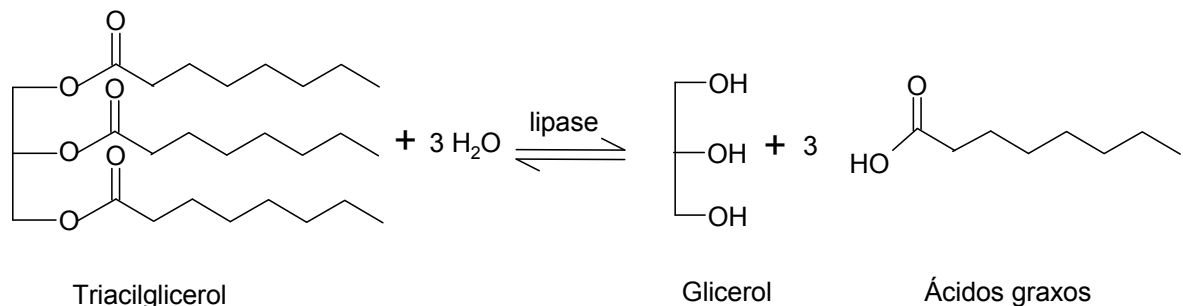
3.1 LIPASES: DEFINIÇÃO, ASPECTOS ESTRUTURAIS E MECANISMOS DE AÇÃO

Pertencentes a um grupo das substâncias químicas, as enzimas podem ser consideradas como catalisadores da natureza (LOUWRIER, 1998), formadas por polímeros de aminoácidos, unidos através de ligações peptídicas, sendo, portanto, um tipo de proteína. Sua função é catalisar reações quebrando moléculas ou juntando-as para formar novos compostos. As enzimas possuem alta especificidade pelo substrato sobre os quais atuam, e até mesmo, específicas para algum tipo de reação.

Os lipídeos constituem grande parte da biomassa da terra, e as enzimas lipolíticas desempenham um papel importante na transformação destes compostos insolúveis em água. Elas estão envolvidas na quebra e na mobilização destes lipídeos no interior das células de organismos individuais, assim como na transferência de lipídeos de um organismo para outro (BEISSON et al., 2000).

Lipase é nome de um grupo de enzimas que fazem parte da classe das hidrolases (E.C.3.1) com atuação em ligações éster (E.C. 3.1.1). As lipases são definidas como glicerol éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3) que catalisam a hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa (cadeia acila acima de 10 átomos de carbono), a diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol. Em contraste com as esterases, as lipases são ativadas na interface entre as fases aquosa e lipídica e não hidrolisam substratos dissolvidos na solução. A diferença também é devido à preferência dessas duas enzimas; as lipases têm especificidade por triacilglicéris de cadeia longa, já as esterases atuam sobre mono ésters e liberam ácido graxos de baixa massa molecular (VERGER, 1997; JAEGER; REETZ, 1998; JAEGER et al., 1999; SHARMA et al., 2001; JAEGER; EGGERT, 2002). A Figura 1 ilustra a ação catalítica de hidrólise das lipases.

Figura 1 – Ação catalítica das lipases. Um triacilglicerol pode ser hidrolisado a glicerol e ácidos graxos, ou o reverso (síntese) que combina glicerol e ácidos graxos para formar triacilgliceróis.



Fonte: JAEGER; REETZ (1998).

As lipases também catalisam a reação reversa (síntese), combinando glicerol e ácidos graxos para formar triacilgliceróis (JAEGER; REETZ, 1998; JAEGER et al., 1999; SHARMA et al., 2001; JAEGER; EGGERT, 2002). Além da hidrólise e da síntese de triacilgliceróis as lipases catalisam outros tipos de reações (Figura 2) como esterificação, transesterificação que incluem a interesterificação, alcólise e acidólise, reações de aminólise e lactonização (GHOSH et al., 1996; PAQUES; MACEDO, 2006).

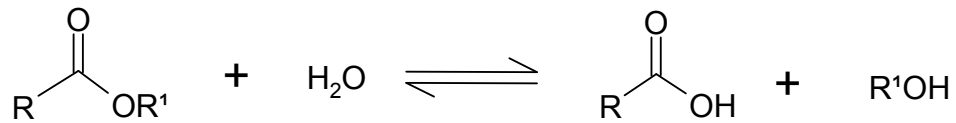
Dois critérios têm sido utilizados para definir uma lipase verdadeira (SHARMA et al., 2011):

- a) Ativar-se em presença de uma interface, ou seja, sua atividade deve aumentar assim que formar uma emulsão com o triglicérido. Este fenômeno é conhecido como “ativação interfacial”;
- b) Deve conter uma superfície com uma sequência de proteína cobrindo o sítio ativo da enzima que é chamado de “tampa” que se afasta em contato com a interface.

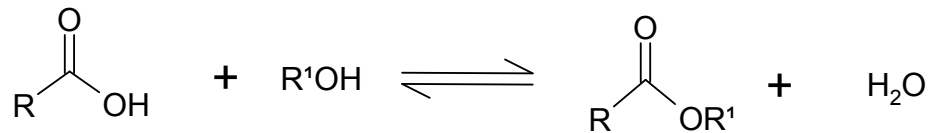
O fenômeno de “ativação interfacial” que ocorre na presença de um substrato pelo movimento da “tampa” expondo o sítio catalítico da enzima é uma característica única das lipases e é responsável pela versatilidade de reações que catalisam (KAZLAUSKAS, 1994; JAEGER; REETZ, 1998; FERNANDEZ-LORENTE, 2008; MALA; TAKEUCHI, 2008).

Figura 2 – Reações catalisadas por lipases

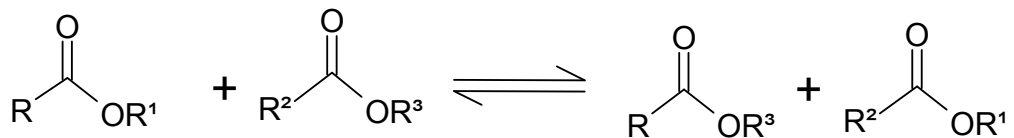
Hidrólise



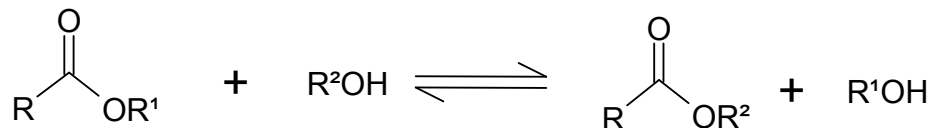
Esterificação



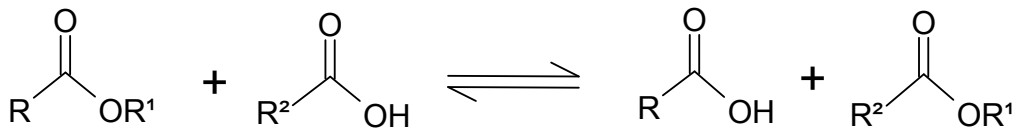
Interesterificação



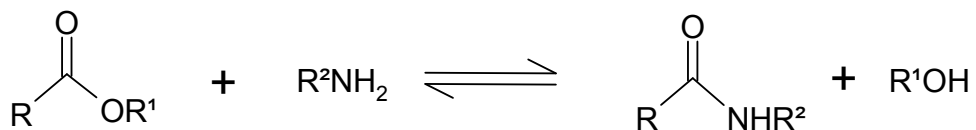
Alcólise



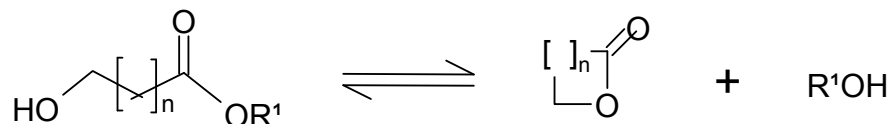
Acidólise



Aminólise



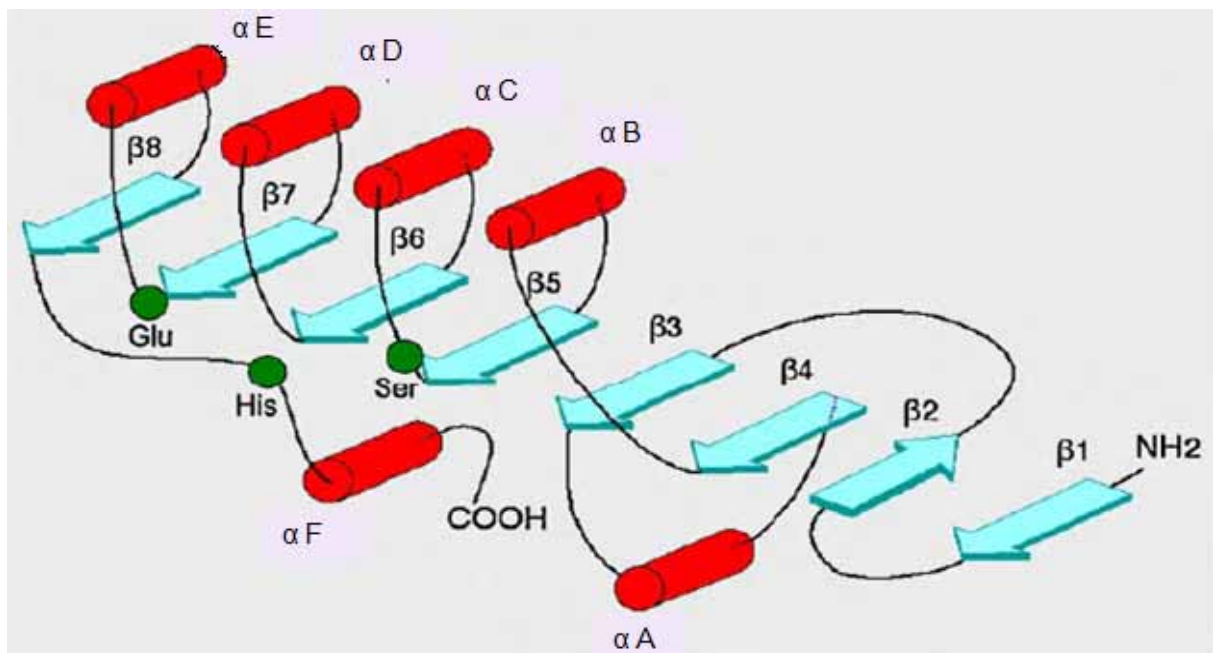
Lactonização

**Fonte:** PAQUES; MACEDO (2006)

Em geral, as lipases microbianas são proteínas com 20-60kDa que apresentam uma característica de dobra padrão conhecida como α/β hidrolase (Figura 3). O núcleo destas enzimas é constituído por uma folha β central com até oito fitas diferentes (β_1 - β_8) conectadas por até seis α hélices (A-F). O sítio ativo é

formado por uma tríade catalítica composta pelos aminoácidos serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina. O resíduo nucleofílico serina está localizado no carbono terminal da folha β_5 em um pentapeptídeo bem conservado na forma de GX SXG (G=glicina, S=serina, X1=histidina e X2=ácido aspártico ou glutâmico) formando a característica β em torno de α , constituindo o “cotovelo nucleofílico”(KAZLAUSKAS, 1994; JAEGER; REETZ, 1998; MALA; TAKEUCHI, 2008). O grupo carboxilato do ácido aspártico (ou glutâmico) está ligado por ligações de hidrogênio à histidina e o nitrogênio da histidina está ligado também por ligações de hidrogênio ao álcool da serina (JEGANNATHAN et al., 2008).

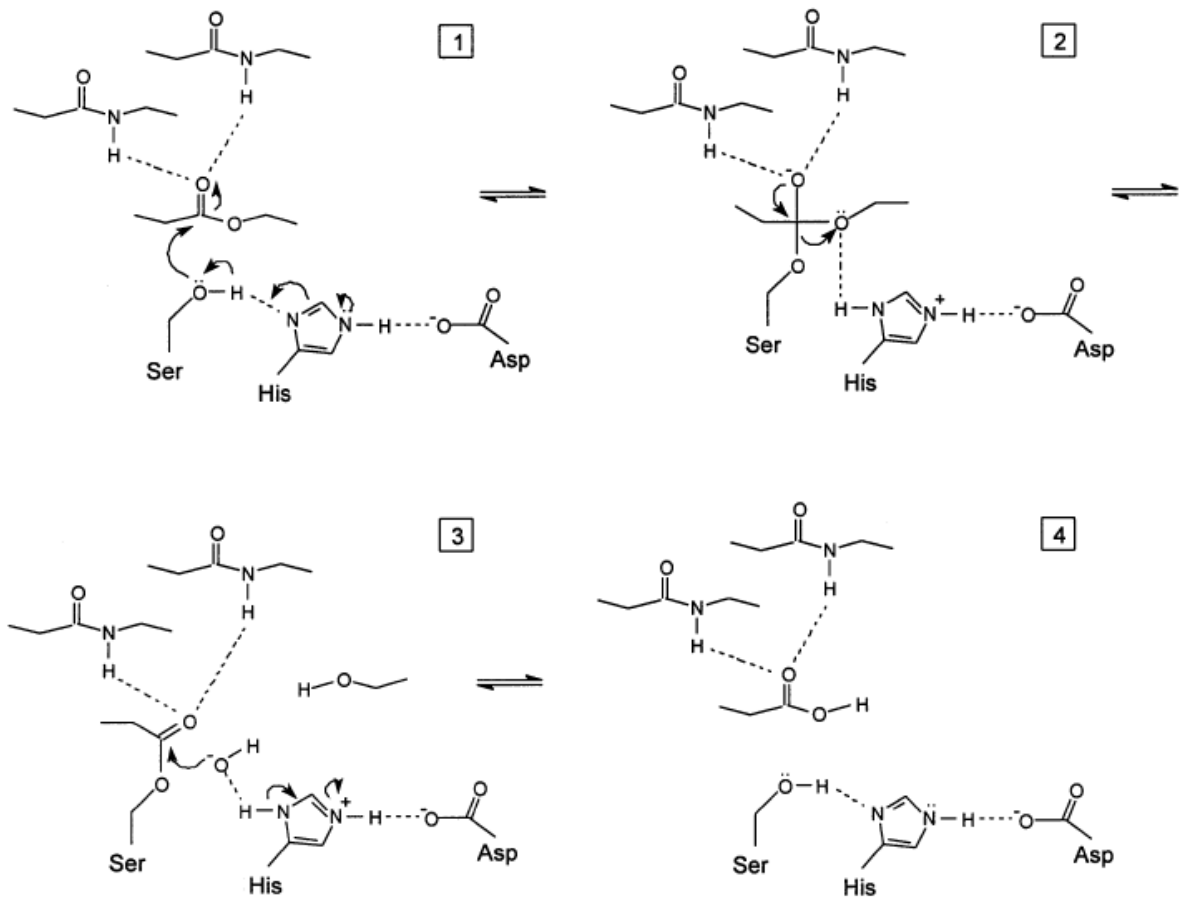
Figura 3 – Diagrama esquemático da estrutura de dobra α/β hidrolase. As α hélices estão apresentadas como cilindros vermelhos, as fitas β como setas azuis e os três resíduos pertencentes ao sítio ativo são mostrados como círculos verdes.



Fonte: adaptado de DVIR et al. (2010)

O mecanismo de hidrólise inicia-se pelo ataque nucleofílico do oxigênio da serina no átomo de carbono da ligação éster do triacilglicerol o que leva a formação de intermediário estabilizado por ligações de hidrogênio com os átomos de nitrogênio da cadeia peptídica. Um álcool é liberado, formando um complexo acil-lipase que é finalmente hidrolisado com a liberação de um ácido graxo e a regeneração da lipase (JAEGER; REETZ, 1998; JAEGER et al., 1999). O mecanismo está apresentado na Figura 4.

Figura 4 – Mecanismo de hidrólise de um triacilglicerol por lipases.

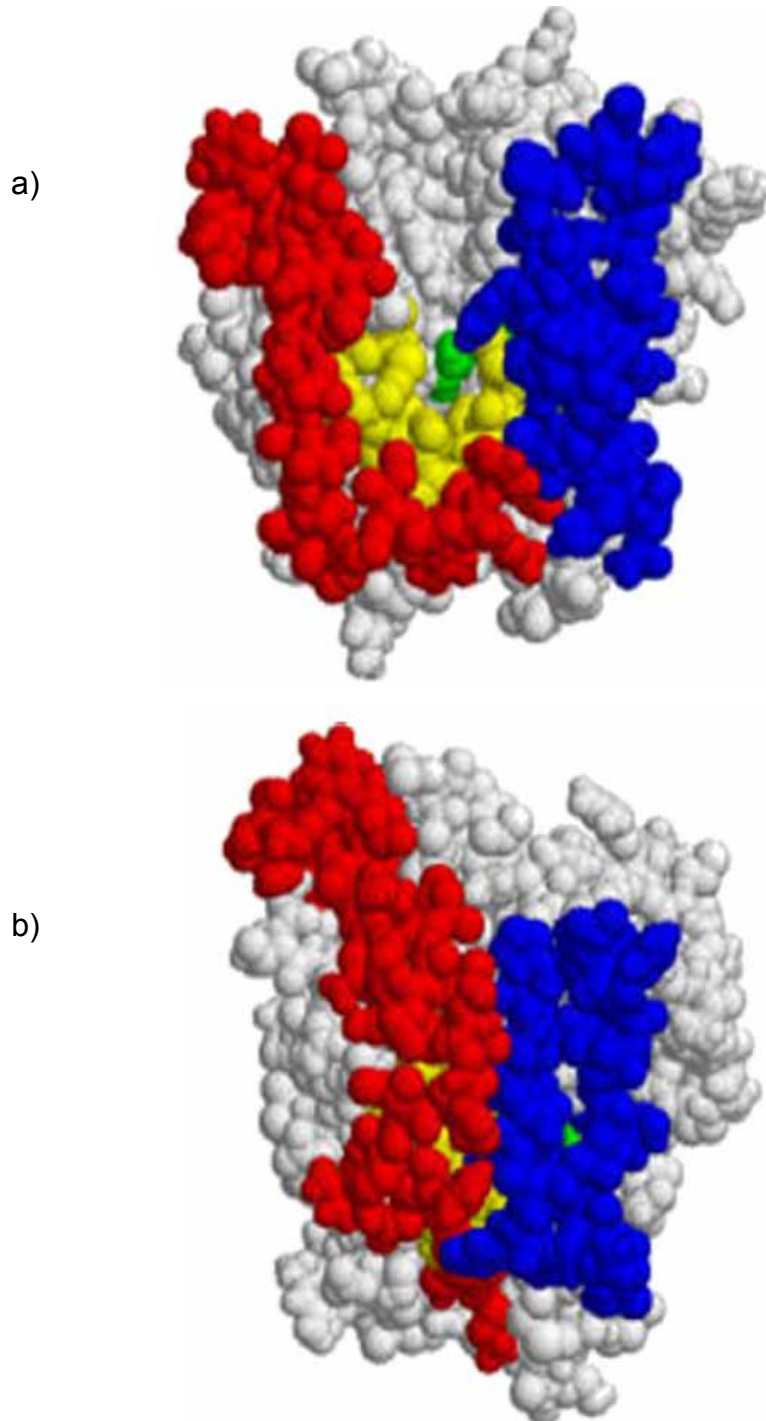


Fonte: JAEGER et al. (1999)

A elucidação da estrutura 3D das lipases colaborou para a explicação da ativação interfacial (JAEGER; REETZ, 1998). A primeira estrutura tridimensional elucidada de lipase microbiana foi a lipase de *Rhizomucor mieheiem* 1990a partir de análise de raios-X cristalográficos (JAEGER; REETZ, 1998; MALA; TAKEUCHI, 2008). Depois disso outras estruturas têm sido estudadas com o auxílio de ferramentas de bioinformática (MALA; TAKEUCHI, 2008).

A Figura 5 ilustra o movimento da tampa durante a ativação interfacial promovido pelas lipases.

Figura 5 – Simulação do movimento da tampa da lipase de *Pseudomonas aeruginosa* a) na forma aberta revelando seu sítio ativo e b) forma fechada. O sítio ativo esta representado em amarelo e as tampas em azul e vermelho.



Fonte: CHERUKUVADA et al. (2005)

3.2 PRODUÇÃO DE LIPASES

As enzimas lipolíticas são produzidas por organismos eucariontes superiores (plantas e animais) e inferiores (micro-organismos). Dentre estes últimos, as leveduras e fungos como também os micro-organismos procariontes (bactérias, incluindo-se os actinomicetos), são produtores de lipases e suas propriedades variam de acordo com a procedência (SHARMA et al., 2001; SAXENA et al., 2003; JOSEPH et al., 2007). Existe um grande número de bactérias e fungos produtores de lipases. Dentre os fungos produtores de lipases destacam-se os gêneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Humicola* e *Candida* (GHOSH et al., 1996).

As lipases microbianas são as mais utilizadas industrialmente e podem ser obtidas principalmente por fermentação submersa (FSub), porém a fermentação em estado sólido (FES) constitui uma opção promissora, quando resíduos agroindustriais são utilizados como fonte de substrato (MALA et al., 2007; WANG et al., 2008).

A maioria das lipases microbianas é extracelular, sendo excretadas da célula para o meio de cultura. A produção, geralmente por FSub em um meio complexo, a quantidade de lipase produzida é dependente de fatores como pH, temperatura, agitação, fontes de carbono, nitrogênio, fosfato, lipídeo, etc (GHOSH et al., 1996; SHARMA et al., 2001). Óleos vegetais e gorduras parecem ser as fontes de carbono preferidas para indução de lipases (DALMAU et al., 2000; POGORI et al., 2008; LIU et al., 2012a). Entretanto alguns relatos demonstraram boa produção de lipase sem fontes lipídicas como indutores (LIN; KO, 2005; SEKHON et al., 2006).

3.2.1 *Botryosphaeria Ribis* EC-01 como Produtor de Lipase

A bioquímica e fisiologia de fungos da família *Botryosphaeriaceae* vem sendo estudada desde 1995, quando Barbosa e colaboradores isolaram o ascomiceto *Botryosphaeria* sp.(MAMB-05) de cancro de eucalipto (BARBOSA et al., 1995; BARBOSA et al., 1996).

Nove isolados do gênero *Botryosphaeria* foram cultivados separadamente em oito óleos vegetais diferentes (soja, oliva, girassol, milho, canola, babaçu, gergelim e algodão), e também em glicerol, em condição de fermentação

submersa, para selecionar o melhor produtor de lacase e lipase. *B. rhodina* MAMB-05 destacou-se como produtor de lacase em todos os óleos avaliados, enquanto que *B. ribis*EC-01 foi o melhor produtor de lipase nos cultivos contendo óleo de milho ou óleo de soja. Todavia, a atividade específica da lipase foi maior nos cultivos contendo óleo de soja ou glicerol (MESSIAS, 2008; MESSIAS et al., 2009)

A bioquímica e parte da fisiologia de *Botryosphaeria ribis* EC-01 foi estudada por Messias (2008) visando aumentar a atividade específica da lipase que subiu de 20 U/mg para 413 U/mg, em escala de frascos Erlenmeyer, utilizando como substrato óleo de soja e glicerol, em condição otimizada por planejamento fatorial sob fermentação submersa. Esta mesma lipase hidrolisou ésteres de *p*-nitrofenila e triacilgliceróis de cadeia curta, média e longa, o que é importantíssimo para futuras aplicações biotecnológicas. As propriedades da lipase de *B. ribis*EC-01 quanto à estabilidade em diferentes valores de pH, temperatura e em solventes orgânicos, incluindo-se o etanol, por longo período de tempo, à temperatura ambiente, também foram determinados (MESSIAS et al., 2009).

Resíduos agroindustriais foram avaliados na produção de exoenzimas por *Botryosphaeria*. Comparou-se a produção de lacases e lipases por *Botryosphaeria ribis*EC-01 e *Botryosphaeria rhodina*MAMB-05, em tortas de milho, soja, mamona e azeitona como fonte única de carbono, sob fermentação em fase sólida. *B. ribis*EC-01 novamente se destacou como produtor de lipases em todos os resíduos avaliados (COSTA, 2008).

Em estudos relacionados, três tortas oleaginosas (mamona, milho e soja) foram avaliadas como substratos para a produção de lipases sob condição de fermentação submersa por *B. ribis* EC-01, quando suplementado com meio mínimo de sais de Vogel. A adição do meio mínimo às tortas diminuiu fortemente a produção de lipase com a torta de mamona e soja como substratos (BARBOSA et al., 2011).

A região norte do Paraná possui muitas indústrias de produção de óleo de soja, e, portanto, disponibilidade de tortas, resultantes da extração destegrão. Assim, pode ser uma fonte viável e econômica para desenvolvimento de micro-organismos, como *B. ribis*EC-01, pré-selecionado como produtor de lipase em fermentação submersa. Através de uma revisão prévia na literatura científica constatou-se que não existem relatos sobre a produção de lipases por este fungo utilizando-se a torta de soja, ou outra torta vegetal como fonte de substrato, a

não ser as disseminações desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa até o presente.

3.2.2 Resíduos Agroindustriais como Substratos para Produção de Lipases

Resíduos agro-industriais como o bagaço de cana, palha de cereais (trigo, arroz), palha de milho e espigas e tortas residuais da extração de óleos vegetais (por exemplo soja) são excelentes fontes de nutrientes para o cultivo de microrganismos para a produção de produtos químicos (enzimas, álcoois, ácidos orgânicos, solventes, ácidos aminados). Tortas vegetais podem conter até 50% de proteína, juntamente com carboidratos e lipídeos residuais (RAMACHANDRAN et al., 2007) e são utilizados principalmente como alimentos para animais (ruminantes, aves, peixe). São também excelentes substratos utilizados na fermentação para cultivar microrganismos para a produção de enzimas como lipases (BARBOSA et al., 2011; RAMACHANDRAN et al., 2007).

As tortas vegetais são amplamente utilizadas na fermentação em estado sólido (FES) para produção de enzimas por espécies fúngicas e servem de fontes de carbono e nitrogênio e também como suporte ao micro-organismo (RAMACHANDRAN et al., 2007). E ainda, a utilização de subprodutos agroindustriais como substrato na produção de enzimas, além de agregar valor a materiais de baixo custo no mercado pode reduzir o custo final da enzima (CASTILHO et al., 2000). Estudos utilizando estas tortas vegetais para produção de lipases por FES têm mostrado resultados promissores (KAMINI et al., 1998; UL-HAQ et al., 2002; RODRIGUEZ et al. 2006; EDWINOLOVER et al., 2010; RIGO et al., 2010; FERRAZ et al., 2012).

Kamini et al. (1998) utilizando torta de gergelim para a produção de lipase por *Aspergillus niger* MTCC 2594 por FES conseguiu produção de 363,6 U/g de substrato seco (U/gss). Já ul-Haq et al. (2002) para a produção de lipase por *Rhizopus oligosporus* por FES utilizando torta de amêndoa conseguiu 48 U/gss. *Rhizopus homothallicus* foi cultivado em bagaço de cana de açúcar para a produção de lipase por FES em um meio suplementado por ureia e azeite de oliva. A máxima produção alcançada foi de 826 U/gss em 12 horas de cultivo. A FES utilizando três substratos foi estudada por Edwinolover et al. (2010) que utilizaram farelo de trigo, torta de coco e semolina para produzir lipase por *Aspergillus niger*. A máxima foi de

628,7 U/gss em 96 h. A torta de soja foi utilizada por FES na produção de lipase por *Penicillium sp.* e as máximas produções foram de 139,2 e 140,7U/gss em culturas suplementadas com ureia e óleo de soja, respectivamente. As tortas de soja, arroz e também bagaço de cana foram testadas para a produção de lipase de *Sporobolomyces ruberrimus* por FES e as atividades obtidas para esses substratos foram 130,1 U/g, 164,2 U/g e 189,5 U/gss, respectivamente (FERRAZ et al., 2012).

A composição nutricional das tortas podem variar de acordo com a qualidade da semente, método de extração do óleo, armazenamento, etc. A torta de soja, por exemplo, é rica em aminoácidos, principalmente triptofano, treonina e lisina mas é deficiente de metionina. A torta de sojadormina o mercado das tortas oleaginosas com uma produção mundial de 177,8 milhões de toneladas entre 2010-11, de que o Brasil produziu 27,9 milhões de toneladas e ocupa a terceira posição no mundo (USDA, 2011). Entretanto, esta torta é pouco utilizada para produção de lipases por FSub.

A Tabela 1 apresenta alguns autores que utilizaram a torta de soja como substrato para produção de lipases por FSub, as condições utilizadas e seus resultados. Como pode ser observado o uso da torta de soja contribuiu para o crescimento do micro-organismo e bons resultados foram alcançados, pois este substrato constitui fonte de carbono e também nitrogênio (RAMANCHANDRAN et al., 2007). Entretanto o seu uso geralmente está combinado com outros nutrientes, o que pode encarecer o meio. O uso alternativo deste substrato juntamente com outras fontes residuais, como por exemplo o glicerol residual proveniente da produção do biodiesel pode ajudar a baixar o preço final da enzima.

Tabela 1 – Torta de soja como substrato para produção de lipases por fermentação submersa

| Micro-organismo | Tempo (h) | Temp. (°C) | Agit. (rpm) | Fonte de Carbono | Fonte de Nitrogênio | Outras fontes | Atividade lipase U/mL | Referência |
|--|-----------|------------|-------------|---|--|---|-----------------------|------------------------------|
| <i>Penicillium citrinum</i> | - | - | - | Peptona (5%) | Milhocina, Torta de soja | - | 1,12 | Sztajer ; Maliszewska (1989) |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | 72 | 28 | | Glucose (2%) Polipeptona (2%) | Ext. levedura (1%) Torta de soja (3%) | - | 0,78 | Ohnishi et al. (1994) |
| <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> F-111 | 22 | 30 | 250 | Azeite de oliva (0,4%), Torta de soja (1%), Peptona (1,5%), Triton X-100 (0,2%) | Ext. levedura (0,5%) | KH ₂ PO ₄ (0,3%) MgSO ₄ (0,04%) Na ₂ CO ₃ (1%) | 3000 (U) | Lin et al. (1996) |
| <i>Aeromonas sobria</i> LPO04 | 52 | 37 | 200 | Glucose (0,1%) | Torta de soja (1%) Ext. levedura (0,5%) Soro do leite (25%) | Na ₂ HPO ₄ (7,3%), KH ₂ PO ₄ (3,2%) MgSO ₄ (40µg/mL), FeSO ₄ (4 µg/mL) | 1,35 | Dharmsthiti; Luchai (1998) |
| <i>Candida</i> sp. 99-125 | 120 | 26 | 220 | Óleo de soja (4,19 %), Span 60 (0,1%) | Torta de soja (5,8%) (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,1% | K ₂ HPO ₄ (0,28%), KH ₂ PO ₄ (0,1%) MgSO ₄ (0,05%) | 6200 | He; Tan (2006) |
| <i>Candida antarctica</i> DSM-3855 | 58 | 26 | 250 | Torta de soja (3,2%) Óleo de soja (0,5%) Tween 80 (0,1%) | Ext. levedura (0,5%) | K ₂ HPO ₄ (0,4%) MgSO ₄ (0,1%) | 25,5 | Liu; Zhang (2011) |

Fonte: próprio autor

3.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS LIPASES FÚNGICAS

3.3.1 Influência da Temperatura, pH, Solventes e Outros

A termoestabilidade é uma importante característica para as lipases de aplicações industriais. A termo estabilidade permite o uso de temperaturas mais elevadas, que é mais vantajoso devido ao aumento da reatividade, permitindo taxa de reação mais elevada e menores problemas de difusão. O aumento da temperatura da reação traz outros benefícios como maior rendimento pelo aumento da solubilidade dos substratos, viscosidade mais baixa e diminuição dos problemas de contaminação (HASAN et al., 2006; ANDUALEMA; GESSESSE, 2012).

As enzimas termoestáveis podem ser obtidas a partir de organismos mesófilos e termófilos e até os psicrófilos têm produzidos algumas enzimas termotolerantes (HASAN et al., 2006).

Ultimamente um novo tipo de lipase vem chamando atenção; são as do tipo “cold active”: estáveis em baixa temperatura. Essas enzimas têm sido escolhidas por químicos orgânicos, farmacêuticos, engenheiros de processos, etc. devido a sua operação em baixas temperaturas. Essas enzimas representam oportunidade de novos avanços biotecnológicos e o seu uso tende a aumentar nos últimos anos (ANDUALEMA; GESSESSE, 2012).

Outro parâmetro físico-químico que influencia diretamente as interações entre o sítio ativo da enzima e o substrato na catálise é o pH (CHANIHIAN et al., 2006; ZHENG et al., 2011). A superfície da proteína constitui uma interface na qual atuam forças eletrostáticas intermoleculares de longo alcance que são dependentes do pH (FOJAN et al., 2000). A aplicação industrial de uma lipase requer que esta seja ativa numa ampla faixa de pH (GUNASEKARAN; DAS, 2005).

A capacidade de catalisar reações em meio orgânico é fundamental para a aplicação industrial das lipases, juntamente com outras propriedades como especificidade, estabilidade térmica, tolerância de pH (SHU et al., 2006; GUNASEKARAN; DAS, 2005). As lipases apresentam elevada estabilidade em solventes orgânicos. Em condições aquo-restritas (em presença de solventes orgânicos), as lipases catalisam diversas reações de síntese como esterificação, transesterificação e interesterificação (KAPOOR; GUPTA, 2012).

As lipases por atuarem na interface lipídeo-aquosa, em um sistema heterogêneo, o seu modelo cinético não pode ser descrito pelas equações de Michaelis-Menten, pois estas são válidas apenas se a reação catalítica ocorre em uma fase homogênea. Alguns estudos indicam que o problema na aplicação da teoria clássica de Michaelis-Menten para estes sistemas é a expressão para a “concentração de substrato”. Foi então sugerido que a lipólise dependia da área superficial disponível do substrato, assim, quando a concentração do substrato, e o valor de K_M forem expressos como área interfacial por unidade de volume, seguiria a cinética de Michaelis-Menten. Outras técnicas, como a microscópica, foram estudadas para determinar a cinética de uma reação catalisada por lipases (VERGER et al., 1973; KIERKELS et al., 1990; JAEGER; REETZ, 1998). Entretanto, quando uma lipase segue o comportamento de Michaelis-Menten, ou seja, a velocidade de reação é proporcional ao aumento da concentração do substrato, as constantes são chamadas de “aparentes”. Na literatura existem relatos deste tipo de comportamento para lipases (KIERKELS et al., 1990; REDONDO et al., 1995; SÁNCHEZ et al., 1996; NAOE et al., 2001; GHIACI et al., 2009; PASQUEVICH et al., 2011).

As lipases de origem microbianas são as que apresentam melhores vantagens para aplicações biotecnológicas, pois apresentam custo mais baixo de produção e são mais estáveis (HASAN et al., 2006). A Tabela 2 apresenta algumas características físico-químicas de lipases fúngicas produzidas por Fsub.

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas das lipases fúngicas produzidas por fermentação submersa

| Fonte de lipase | Substrato | T (°C) ótima | pH ótimo | Estabilidade térmica | Estabilidade pH | K_M (mM) | $V_{máx}$ ($\mu\text{mol min}^{-1}$ mg) | Referência |
|------------------------------------|---------------------------------|-----------------|-------------|--|--------------------------------|---------------|--|------------------------|
| <i>Candida cylindracea</i> | Óleo de palma | - | - | - | - | 8,2 | 1,3 | Knezevic et al. (1998) |
| <i>Fusarium solani</i> | palmitato <i>p</i> -nitrofenila | - | - | 30-35 °C ~100% atividade mantida em 1 h de incubação | - | 1,8 | 1,7 | Maia et al. (2001) |
| <i>Aspergillus carneus</i> | Azeite de oliva | 37 | 9 | 70 °C por 5 min. | 8-10 por 24 h | - | - | Saxena et al. (2003) |
| <i>Geotrichum marinum</i> | Azeite de oliva | 40 | 8 | Estável 20-40 °C por 1 h; 60 e 80 °C por 5 min (perda de 90% da atividade) | - | 11,5 | 1000 | Huang et al. (2004) |
| <i>Penicillium aurantiogriseum</i> | palmitato <i>p</i> -nitrofenila | 60 | 8 | 37, 45, 50 °C manteve 77, 45 e 32 % de atividade, respec. por 30 min. | 5-9 por 1 h (> 80 % atividade) | - | - | Lima et al. (2004) |
| <i>Penicillium chrysogenum 9'</i> | tributirina | 30* | 5* 7** | Estável a 20 °C por 1 h; 40 °C manteve 50 % de sua atividade; 60-70 < 20 % de sua atividade por 15 min | - | 2,33 | 22,1 (U _{mL} ⁻¹) | Bancerz et al. (2005) |
| <i>Trichoderma Viride</i> | - | - | - | - | - | 1,14 | 0.056 | Kashmiri et al. (2006) |
| <i>Aspergillus niger</i> F044 | palmitato <i>p</i> -nitrofenila | 45 | 7 | 98,7 % da atividade a 60 °C por 30 min | 2-9 por 4 h | 7,37 | 25,91 | Shu et al. (2007) |
| <i>Rhizopus chinencis</i> | Azeite de oliva | 30 | 6 | 70 °C manteve 60 % da atividade por 1 h | 4-10 por 1 h | - | - | Pogori et al. (2008) |

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas das lipases fúngicas produzidas por fermentação submersa (continuação)

| | | | | | | | | |
|---|--|----|-----|---|---|--------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> NCIM 1207 | palmitato <i>p</i> - nitrofenila | 50 | 2,5 | Estável 40 °C por 3 h; 50 °C por 1h (perda de 52 % da atividade) | 8-11 por 24 h | - | - | Mhetras et al. (2009) |
| <i>Talaromyces thermophilus</i> | Azeite de oliva | 50 | 9,5 | 55 e 60 °C por 1 h retenção de 90 e 60 % da atividade, respect. | 9-11 por 24 h | - | - | Romdhane et al. (2010) |
| <i>Nomuraea rileyi</i> MJ | palmitato <i>p</i> - nitrofenila | 35 | 8 | 15-35 °C por 1 h | 7-9 por 1 h | 2,1 (μ M) | 18,86 | Supakdamrongkul et al. (2010) |
| <i>Penicillium</i> sp. DS-39 (DSM 23773) | palmitato <i>p</i> - nitrofenila | 45 | 5,5 | 45 - 50 °C por 3h (>90 % da atividade) | 5-6 por 24 h (>90 % da atividade) | - | - | Dheeman et al. (2011) |
| <i>Thermomyces lanuginosus</i> | Azeite de oliva | 60 | 9 | Estável a 60 °C por 1 h (> 80 % da atividade); 70, 80 e 90 manteve 44, 45, 40 % da atividade | 8-12 por 1 h | - | - | Zheng et al. (2011) |
| <i>Trichosporon asahii</i> MSR 54 | palmitato <i>p</i> - nitrofenila | 40 | 9 | Estável em 40 e 50 °C mantendo 50 % de sua atividade durante 6 e 2 h, respect. | 9-11 (> 78%) | 55,5 (μ M) | 6,66 (mMmin ⁻¹) | Kumari; Gupta (2012) |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | palmitato <i>p</i> - nitrofenila | 30 | 8 | Estável em baixas temperaturas (-20, 0, 4, 10 e 20 °C manteve 94, 75, 68, 85 e 94 % de sua atividade) | 8-12 | 2,78 | 9,09 | Panuthai et al. (2012) |

autor

* Em óleos naturais

**Em substratos sintéticos

Fonte:
próprio

3.4 APLICAÇÕES DAS LIPASES

O mercado das enzimas em 2012 foi estimado em torno de 2,9 bilhões, sendo os principais produtos carbohidrases, proteases e lipases (HASAN et al., 2010; SANGEETHA et al., 2011). As lipases estão sendo cada vez mais produzidas industrialmente e por tecnologias mais avançadas. A maioria das lipases comerciais é de origem fúngica (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Nos últimos anos, as enzimas lipolíticas estão chamando a atenção por seu potencial biotecnológico. Elas constituem o grupo mais importante de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas devido sua versatilidade e propriedades e têm sido investigadas por sua multiplexidade de reações e grande especificidade (HASAN et al., 2006; MALA; TAKEUCHI, 2008; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Em contraste com outras enzimas, as lipases exibem boa estabilidade e atividade em ambientes não aquosos e essa habilidade facilita uma série de reações que não acontecem naturalmente como a esterificação e a transesterificação. Essa propriedade faz com que seu uso em processos químicos utilizando meios orgânicos seja viável. Outras características importantes para sua aplicação industrial são que não necessitam de cofatores e podem ser produzidas com rendimentos satisfatórios a partir de micro-organismos, em especial, fungos e bactérias (JAEGER; REETZ, 1998; JAEGER; EGGERT, 2002; SHARMA et al., 2011; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Como elas atuam na interface óleo-água podem ser utilizadas em preparações industriais de diversos compostos, catalisando diversos tipos de reações (GHOSH et al., 1996). As lipases são empregadas na indústria de detergentes, na síntese de surfactantes, em biotransformações na indústria óleo-química, em reações de inter e transesterificações nas indústrias de alimentos e agroquímica, no tratamento de resíduos industriais gordurosos, no processamento de cosméticos e medicamentos, indústrias têxteis, de couro e na indústria de papel e celulose (SHARMA et al., 2001; HASAN et al., 2006; JOSEPH et al., 2007; NGUYEN et al., 2008).

Estas enzimas também têm sido estudadas como novos biocatalisadores para a produção de combustíveis, o biodiesel que é produzido a partir de óleos vegetais (SALIS et al., 2005). O interesse crescentena utilização

das lipases como biocatalisadores para a produção de biocombustíveis está relacionado com a facilidade de separação dos produtos gerados, purificação, mínimo tratamento de resíduos e fácil recuperação do glicerol em comparação com os processos químicos de fabricação de biodiesel (BAJAJ et al., 2010; GHALY et al., 2010).

Com as atuais questões ambientais (aquecimento global, efeito estufa, esgotamento da camada de ozônio) o biodiesel tem sido promovido como um combustível renovável e alternativo “amigável ao meio ambiente”. Muitas pesquisas estão em andamento na área de biorrefinamento para viabilizar vias alternativas de energia. No entanto, estas alternativas devem ser tecnicamente aceitáveis, economicamente competitivas, sem causar dano ambiental e estar prontamente disponíveis. O biodiesel tem demonstrado capacidade de atender a demanda energética do mundo nos setores de transporte, agricultura, comércio e indústria (BAJAJ et al., 2010; GHALY et al., 2010).

3.4.1 Biodiesel

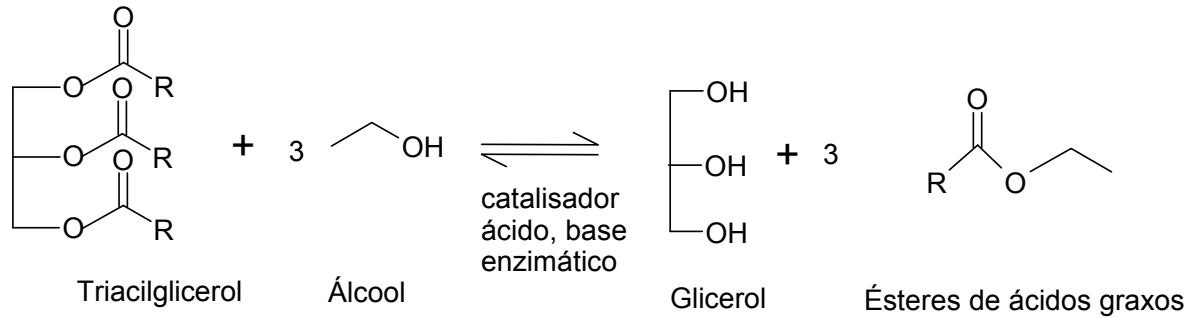
O biodiesel pode ser produzido a partir de gorduras animais ou de óleos vegetais, existindo dezenas de espécies vegetais no Brasil que podem ser utilizadas como a mamona, dendê, girassol, babaçu, amendoim, pinhão manso, soja e outros (MARCHETTI et al., 2007).

O processo mais utilizado atualmente para a produção de biodiesel é a transesterificação que, por sua vez, consiste na reação química dos ácidos graxos contidos nos óleos vegetais ou gorduras animais com o etanol ou o metanol estimulado por um catalisador (FUKUDA et al., 2001). A Figura 6 exemplifica um esquema genérico de produção de biodiesel.

A reação é caracterizada por promover a quebra de moléculas de triésteres de glicerina, gerando misturas de ésteres metílicos ou etílicos dos ácidos graxos correspondentes e liberando glicerina como subproduto (CASTRO et al., 2004). Tais reações podem ser realizadas através do uso de catalisadores ácidos, básicos ou enzimáticos. De forma geral, as indústrias químicas utilizam a catálise básica para a síntese dos ésteres citados, mas esse processo possui vários inconvenientes como a baixa seletividade do catalisador, levando a indesejáveis reações paralelas. Essas desvantagens impulsionaram a pesquisa por novos

catalisadores (SOUMANOU e BORNSCHEUER, 2003). Dentre os novos catalisadores propostos é possível destacar as lipases.

Figura 6 – Produção de biodiesel por transesterificação



Fonte: PARAWIRA (2009)

A transesterificação enzimática utilizando as lipases parece atrativa pois é incentivada pela fácil recuperação do produto e do glicerol, produto de maior pureza e ausência de reações colaterais. A enzima geralmente não é utilizada na sua forma livre, pois o uso da lipase livre pode apresentar algumas dificuldades técnicas como a contaminação do produto com atividade enzimática residual, além do custo econômico, pela perda da enzima para o meio. Então, para superar estes problemas, a enzima é utilizada na forma imobilizada para que possa ser reutilizada várias vezes para reduzir o custo e também melhorar a qualidade do produto (AL-ZUHAIR, 2007; JEGANNATHAN et al., 2008).

Tanto as lipases imobilizadas como as células imobilizadas do próprio microrganismo produtor destas enzimas podem ser utilizadas na produção de biodiesel (NOUREDDINI et al., 2005, HAMA et al., 2007). A maior parte dos estudos tem utilizado as preparações enzimáticas comerciais dos micro-organismos *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Thermomyces lanuginosus* tanto na forma imobilizada como também na forma livre (HSU et al., 2001; ISO et al., 2001; KÖSE et al., 2002; SOUMANOU; BORNSCHEUER, 2003; LAI et al., 2005; NOUREDDINI et al., 2005; SALIS et al., 2005; LI et al., 2006; KUMARI et al., 2007; ROYON et al., 2007; SHA; GUPTA, 2007; RAITA et al., 2010; LIU et al., 2012c). Mas, também na literatura encontram-se publicações utilizando enzimas não comerciais para a produção de biodiesel como as lipases produzidas pelos micro-

organismos *Rhizopusoryzae*, *Candida sp*, *Yarrowia lipolytica* (HAMA et al., 2007; LI; DU; LIU, 2007; LI et al., 2010; MENG et al., 2011).

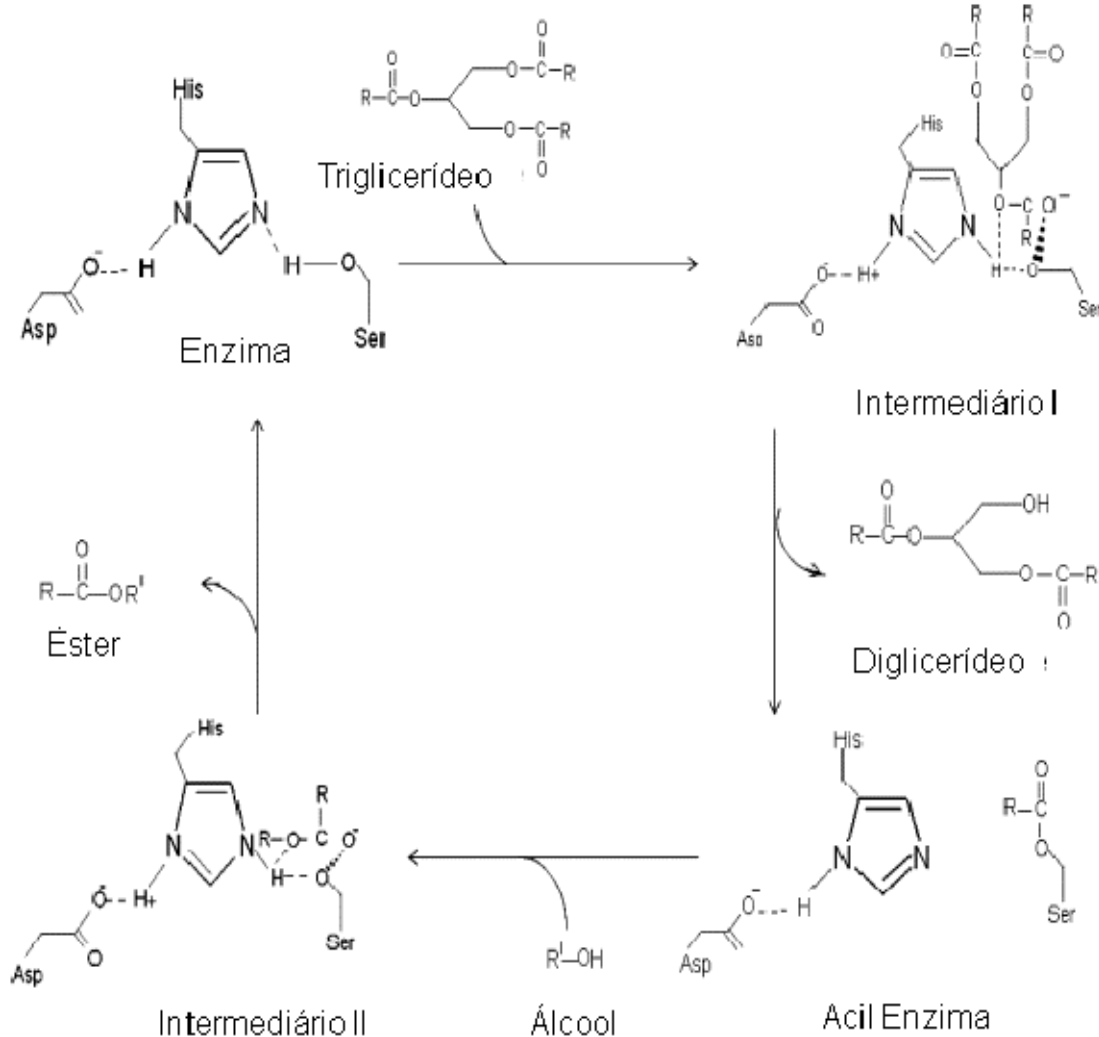
O mecanismo de transesterificação das lipases envolve a tríade catalítica Asp-His-Ser em um sistema de transmissão de cargas (Figura 7). O grupo carboxilato do ácido aspártico (ou glutâmico) está ligado por ligações de hidrogênio à histidina e o nitrogênio da histidina está ligado também por ligações de hidrogênio ao álcool da serina. Primeriamente, a histidina puxa o próton do álcool da serina, formando um oxiânion. O oxiânion serina ataca o carbono do grupo carbonila do substrato, formando o intermediário I. O oxiânion é estabilizado pelo aminoácido próximo que se liga por ligações de hidrogênio. Os elétrons do oxiânion são puxados de volta ao grupo carbonila e o próton que está na histidina é transferido para o diglicerídeo, que é liberado. O éster serina formado reage com o álcool e completa a transesterificação. O nitrogênio da histidina remove o hidrogênio da molécula do álcool formando um ânion óxido alquil. O hidróxido ataca o carbono da carbonila e forma o intermediário II que é estabilizado por ligações de hidrogênio. Os elétrons são puxados de volta para o carbono da carbonila e um ácido graxo livre é formado (JEGANNATHAN et al., 2008).

Alguns fatores interferem na reação de transesterificação catalisada por lipases e estes têm sido extensamente estudados. São eles: massa da enzima, concentração de água e álcool na reação, uso de solventes, estabilidade térmica da enzima e temperatura na transesterificação são cruciais e devem ser investigados (ANTCZAK et al., 2009; FJERBAEK et al., 2009; BAJAJ et al., 2010; GHALY et al., 2010).

Os alcoóis utilizados na síntese de biodiesel são o metanol, etanol, propanol, isopropanol, 2-propanol, n-butanol e isobutanol. O metanol e o etanol são os mais baratos e produzidos em grande escala, portanto são os mais utilizados. A estrutura e a concentração do álcool afetam a estabilidade da enzima. As proteínas normalmente são instáveis nestes alcoóis de cadeia curta, então as lipases podem ser desativadas pelo contato com o álcool não solubilizado, que ocorrem em gotículas no óleo. Para evitar este problema, a quantidade a ser adicionada deve ser fracionada, sendo inferior à sua solubilidade em óleo e a mistura é mantida em agitação para diminuir o tamanho das gotículas insolúveis de álcool da emulsão. O uso de solventes para solubilizar o metanol e também uso de outros aceptores de acila tem sido proposto. A razão molar dos substratos deve ser considerada, pois um

excesso de álcool em relação à quantidade de óleo pode aumentar o rendimento de transesterificação, mas também pode desativar a enzima como citado acima (AL-ZUHAIR, 2007;ANTCZAK et al., 2009; GHALY et al., 2010).

Figura 7 – Mecanismo de catálise das lipases na transesterificação



Fonte: JEGANNATHAN et al. (2008)

A temperatura ótima de reação na transesterificação enzimática depende da interação da estabilidade operacional do catalisador e da taxa de reação, que depende da razão molar óleo:álcool, tipo de solvente orgânico e termoestabilidade da enzima. Esta temperatura tem sido relatada entre 30-55 °C. A presença de água na reação é um dos fatores mais importantes da transesterificação enzimática do biodiesel, pois aumenta a eficiência catalítica da enzima. Pequenas alíquotas de água são adicionadas à mistura de reação, sendo

que esta alíquota não pode favorecer a reação de hidrólise do óleo. Esta quantidade é otimizada e mantida a um nível mínimo (ANTCZAK et al., 2009; FJERBAEK et al., 2009; GHALY et al., 2010).

Ainda, utilizando-se enzima imobilizada existe o problema da transferência de massa, pois moléculas grandes (triacilglicerol) têm que se difundir por pequenos poros para atingir a enzima. Dependendo do suporte pode haver limitações neste transporte, diminuindo a eficiência da enzima. Limitações de transferência externas também podem surgir se um filme recobrir o suporte, impedindo o acesso à enzima (FJERBAEK et al., 2009).

Diferentes processos de obtenção de biodiesel via catálise enzimática vêm sendo desenvolvidos, combinados com outras técnicas, como também, tratamento da lipase antes de sua utilização (LAI et al., 2005; TING et al., 2008; MENG et al., 2011).

Um pré-tratamento da lipase Novozym 435 com o solvente *t*-butanol melhorou o desempenho da catálise, aumentando de 48 % para 98 % a conversão em biodiesel. Acredita-se que o pré-tratamento em solvente orgânico muda a conformação da enzima, favorecendo o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima (LAI et al., 2005). Ting et al. (2008) desenvolveram um processo híbrido de produção de biodiesel onde o óleo de soja foi hidrolisado por uma lipase imobilizada e os ácidos graxos livres resultantes foram convertidos a biodiesel por esterificação catalisada por ácido. A síntese de biodiesel em duas etapas foi desenvolvida por Meng et al. (2011) que utilizaram primeiramente a lipase livre de *Yarrowia lipolytica* para hidrolisar o óleo de soja e após destilação, os ácidos graxos livres foram esterificados pela lipase imobilizada. Este método assegura que a lipase não será desativada pelo glicerol formado e não necessita de co-solvente.

O biodiesel por biocatálise também tem sido produzido utilizando-se reatores de leito fixo (CHEN et al., 2009; SALUM et al., 2010), líquidos iônicos (HA et al., 2007), dióxido de carbono supercrítico (LEE et al., 2011).

Entretanto, o processo de catálise enzimática ainda não foi utilizado em escala industrial devido a limitações como a inibição da enzima pelo álcool, perda da atividade enzimática, tempo de reação e custo elevados. Existem vários relatos na literatura a fim de superar estes problemas (RANGANATHAN et al., 2008). Pesquisadores em todo o mundo vêm tentando superar essas limitações da

enzimana produção de biodiesel (HA et al., 2007; CHEN et al., 2008; KUMARI et al., 2009; RAITA et al., 2010; LEE et al., 2011; LIU et al., 2012c).

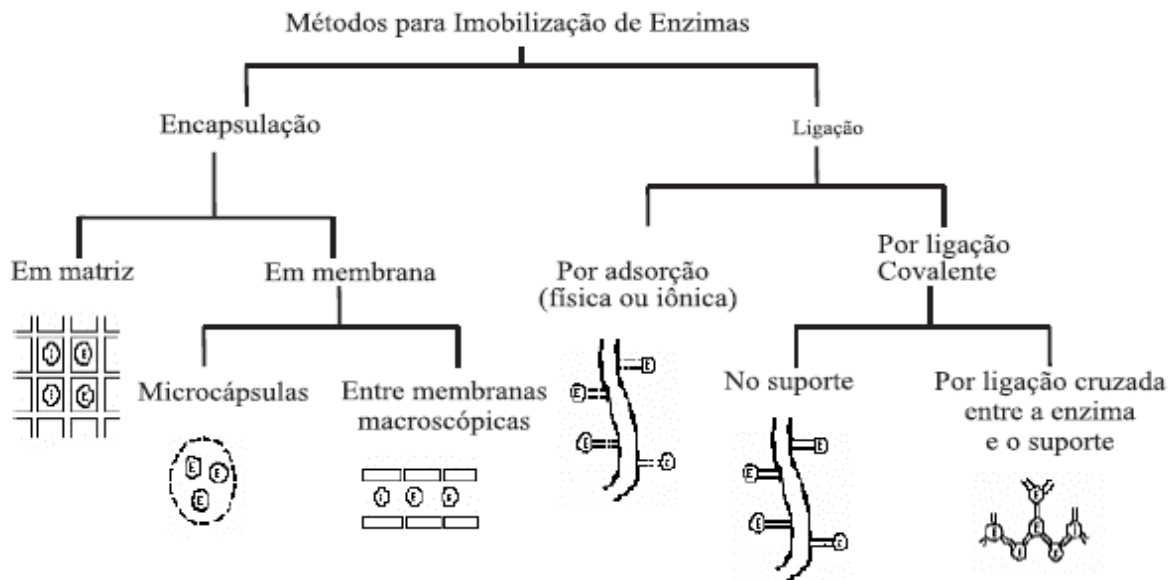
O custo da lipase, que desfavorece sua aplicação na síntese do biodiesel, pode ser solucionado pela produção da enzima utilizando substratos de baixo custo, como os resíduos agroindustriais. E ainda, a possível imobilização desta enzima que permite a sua reutilização, diminuindo ainda mais o custo final do processo. Estas questões podem ser a chave para um processo econômico para a fabricação de biodiesel.

3.4.2 Imobilização de Enzimas

Enzimas imobilizadas são enzimas localizadas numa região de espaço definida, em um material, que permite a separação física da enzima com o meio de reação, mas ao mesmo tempo permeável para reagir como substrato (BALCÃO et al., 1996; JEGANNATHAN et al., 2008).

Geralmente, os métodos para imobilização podem ser classificados em físicos, onde existem forças fracas entre o suporte e a enzima, e químicos, onde ligações covalentes são formadas com a enzima (KRAJEWSKA et al., 2004; JEGANNATHAN et al., 2008). A Figura 8 ilustra os métodos de imobilização.

Os métodos físicos incluem a encapsulação da enzima dentro de uma membrana, adsorção física ou iônica numa matriz insolúvel, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos. Entre os químicos pode-se citar a ligação covalente em matriz insolúvel, reticulação (crosslinking) com uso de reagente multifuncional (DALLA-VECCHIA et al., 2004; ELNASHAR, 2010). Numerosos métodos foram desenvolvidos pela combinação destes ou outros métodos específicos, de um determinado suporte foram criados (KRAJEWSKA et al., 2004).

Figura 8 – Métodos de imobilização de enzimas

Fonte: DALLA-VECCHIA et al. (2004)

A adsorção é o método mais simples e mais utilizado. É de fácil preparação e o seu uso está associado ao baixo custo (BALCÃO et al., 1996; DALLA-VECCHIA et al., 2004; JEGANNATHAN et al., 2008). A enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia como interações de van der Waals, ligações de hidrogênio, entre outros. Vários materiais podem ser utilizados, como polietileno, polipropileno, celite, resinas, celulose, vidro, amberlite, tecido, sílica gel, entre outros (BALCÃO et al., 1996; JEGANNATHAN et al., 2008).

O confinamento em matrizes poliméricas ou em cápsulas consiste em confinar uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula, que cria uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Esta técnica tem a vantagem da enzima não interagir quimicamente com o polímero evitando a desnaturação. Mas, por outro lado pode haver limitação da difusão pela alta concentração de proteína na enzima que obstrui os poros da matriz (DALLA-VECCHIA et al., 2004; JEGANNATHAN et al., 2008).

"Crosslinking" ou reticulação de enzimas envolve a formação de ligações intermoleculares entre as moléculas de enzima com um material, fixação da enzima em matriz por ligação covalente ou formação de ligações cruzadas numa matriz contendo a enzima pelo uso de agentes bifuncionais (DALLA-VECCHIA et al., 2004; JEGANNATHAN et al., 2008). Agentes bifuncionais amplamente empregados

incluem o poli(etilenoglicol) (PEG), glutaraldeído, epícloridrina, dioxal, etienodiamida, carbodiimida, entre outros (KRAJEWSKA et al., 2004).

A principal vantagem da imobilização de enzimas é a facilidade de separação da enzima de seus substratos e produtos e sua reutilização por diversas vezes, reduzindo o custo da enzima e conseqüentemente do produto. Além disso, podem-se listar outras vantagens como a não contaminação do produto pela enzima, melhoria da estabilidade da enzima frente a condições de pH, temperatura, solventes, contaminantes e impurezas (BALCÃO et al., 1996; DALLA-VECCHIA et al., 2004; ELNASHAR, 2010;).

As propriedades das enzimas imobilizadas dependem das características da enzima e do suporte, pois a interação de ambos confere à enzima imobilizada propriedades químicas, bioquímicas, cinéticas e mecânicas específicas (MILETIĆ et al., 2012). Entre as propriedades bioquímicas das enzimas importantes para a imobilização estão a massa molecular e os grupos químicos de superfície. Os grupos funcionais de superfície informam sobre o tipo de interação entre a enzima e o suporte. Outras características importantes são o tipo de reação, cinética e parâmetros de estabilidade e atividade (TISCHER; WEDEKIND, 1999). A Figura 9 apresenta um esquema das propriedades da enzima e do suporte que interferem nas características da enzima imobilizada.

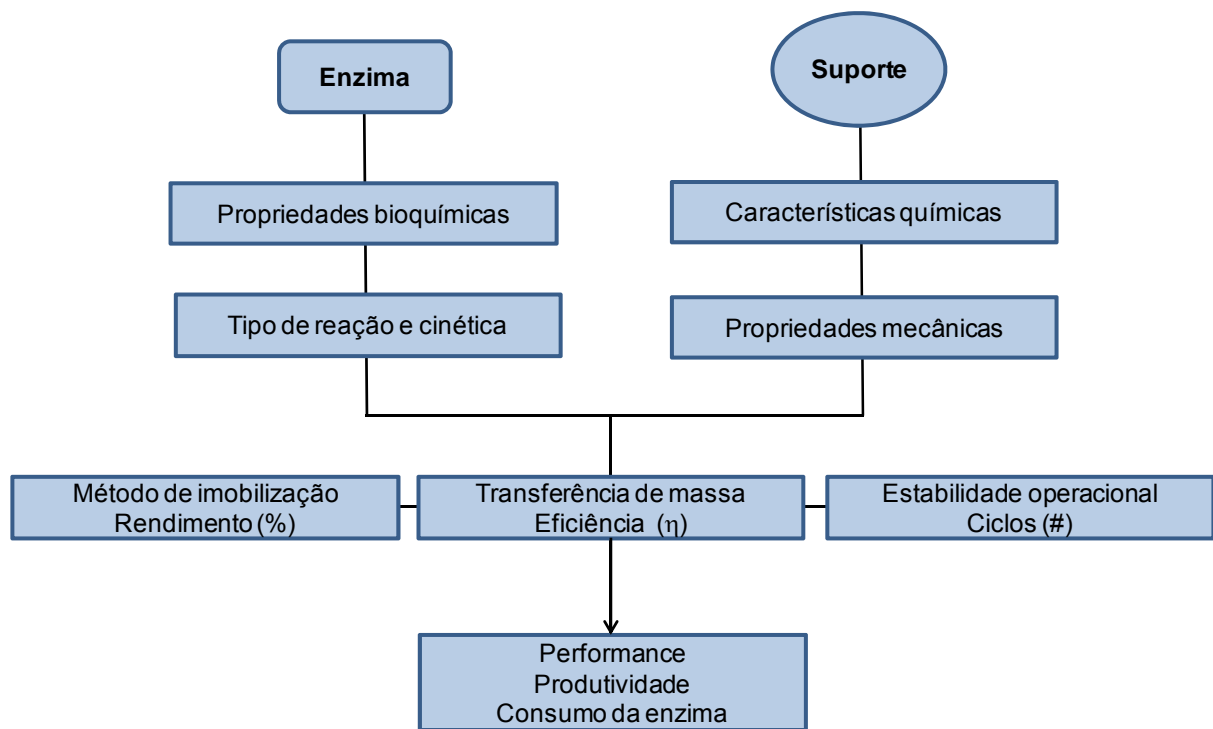
As propriedades do suporte como estrutura química, tamanho de poros, tamanho de partículas e força mecânica, também interferem nas propriedades da enzima imobilizada. O método de imobilização também influencia nas propriedades da enzima imobilizada, sendo que este deve ser escolhido com cuidado (MILETIĆ et al., 2012).

Não existe um suporte universal aplicável a todos os tipos de enzimas, mas, algumas características devem ser consideradas antes da imobilização como alta afinidade por proteínas, disponibilidade de grupos reativos (tanto para ligação direta com a enzima, como também para modificação química do suporte), estabilidade mecânica e alta capacidade de carregamento. E ainda dependendo da sua aplicação, a não toxicidade e a biodegradabilidade podem ser necessárias (FORESTI; FERREIRA, 2007).

A natureza hidrofóbica ou hidrofílica do suporte pode influenciar na ligação entre a matriz e a enzima (TISCHER; WEDEKIND, 1999). A imobilização com suportes hidrofílicos pode reduzir a atividade da enzima durante a sua

aplicação, devido a mudanças conformacionais na enzima. Este tipo de imobilização pode reduzir a solubilidade de substratos hidrofóbicos em regiões hidrofílicas, e o acesso dos substratos ao sítio ativo. A matriz neste caso pode impor uma barreira estérea, resultando na rigidez da estrutura da enzima (DALLA-VECCHIA et al., 2004). Por outro lado, lipases adsorvidas em suportes hidrofóbicos envolvem as áreas hidrofóbicas próximas ao sítio ativo da enzima e deixa estabilizada a sua forma aberta. Isto permite que a enzima fique altamente ativada (MATEO et al., 2007).

Figura 9 – Propriedades da enzima e do suporte que determinam as propriedades da enzima imobilizada



Fonte: adaptado de TISCHER; WEDEKIND (1999)

A forma fechada da lipase é considerada quando o sítio ativo está coberto por uma tampa (cadeia polipeptídica) e em contato com uma superfície hidrofóbica, a tampa se abre e o sítio ativo é totalmente exposto a meio de reação. Devido à interação favorável, a enzima permanece nesta forma aberta que é responsável pelo aumento da atividade enzimática. Entretanto, não são todas as lipases que possuem essa ativação interfacial. Algumas lipases possuem uma tampa anfífila, mas não se ativam em presença de uma interface lipídio-aquosa.

Alguns exemplos são as lipases de *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida antarctica* B (JAEGER; REETZ, 1998; JAEGER et al., 1999).

Independente do suporte e do método de imobilização escolhido, a enzima deve estar acessível ao substrato, mantendo sua atividade e permitir que o sistema enzima/suporte seja regenerado ao final do processo (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

3.4.2.1 Materiais para imobilização de lipases

As lipases têm sido imobilizadas em diversos suportes como quitosana (CHIOU; WU, 2004), resinas (PETKAR et al., 2006), fibras de lã (MONIER et al., 2010), partículas magnéticas (LIU et al., 2012b) e celite (CHANG et al., 2007), envolvendo várias técnicas de imobilização. A adsorção é a técnica mais utilizada devido à facilidade, ausência de produtos químicos caros e tóxicos, custos mais baixos e pelas forças fracas entre enzima e suporte que permitem reter a atividade da enzima (BALCÃO et al., 1996; VILLENEUVE et al., 2000).

Estudos destinados a utilização de materiais baratos como suportes que permitam boa estabilidade e atividade às lipases são muito encontrados na literatura científica. Alguns deles são bentonita, quitosana, amberlite, tecidos, caroço de azeitona, entre outros (YEŞILOĞLU, 2005; FORESTI; FERREIRA, 2007; SCHERER et al., 2011; CHEN et al., 2012; YÜCEL et al., 2012)

Os polissacarídeos são macromoléculas naturais e são derivados de produtos agrícolas ou de crustáceos. A celulose, a goma, a quitina e a quitosana são exemplos de biopolímeros. A celulose e a quitosana são os polímeros mais abundantes da natureza, sendo que os dois possuem estruturas químicas semelhantes, diferindo nos grupos funcionais. O grupo hidroxila está presente nos dois polímeros, mas a quitosana possui também grupos amino. O potencial de aplicação da quitosana, derivado da quitina é imenso passando pelas áreas alimentícias, biotecnologia, ciência de materiais, agricultura e produtos farmacêuticos (AZEVEDO et al., 2007; MENDES et al., 2011).

A quitina é retirada da carapaça de crustáceos e por desacetilação química é produzida a quitosana. Ambas as estruturas são constituídas por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, mas diferem quanto à proporção relativa dessas

unidades de solubilidade. A quitina que é insolúvel, predominam unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranoses, enquanto que a quitosana é solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos e inorgânicos, as unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranoses predominam (AZEVEDO et al., 2007).

Devido à presença de grupos amina reativos na quitosana, diferentes métodos podem ser empregados na imobilização de enzimas com a quitosana; tais como: adsorção, encapsulação e ligação covalente, sendo que este último é o mais empregado, utilizando o glutaraldeído como agente ativador (MENDES et al., 2011). Os grupos aldeídos presentes no glutaraldeído podem formar bases de Schiff mediante ataque nucleofílico aos grupos amino da quitosana e também da enzima, formando ligações covalentes entre estes grupos amino e o grupo carbonila do aldeído (MIGNEAULT et al., 2004; MENDES et al., 2011). As propriedades mecânicas da quitosana podem ser melhoradas por reticulação utilizando o glutaraldeído. Outros agentes bifuncionais também podem ser utilizados como hexametilenodiamina, etilenodiamina, carbodiimidas, epícloridrina, etc (KRAJEWSKA, 2004).

Esse biomaterial tem sido utilizado na imobilização de enzimas sob a forma de pó, flocos e géis de diferentes formas. O uso de microesferas pode incrementar a capacidade de adsorção da quitosana, já que as microesferas possuem uma área superficial cerca de 100 vezes maior do que a em flocos e, também, apresentam cinética de adsorção mais rápida e maior facilidade de manuseio (AZEVEDO et al., 2007).

A quitosana tem sido empregada como suporte na imobilização de enzimas para a produção de biodiesel. A lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada em esferas de quitosana pré-tratadas com hexano por adsorção (NASRATUN et al., 2009). Xie e Wang (2012) imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* covalentemente em esferas de quitosana magnéticas (Fe_3O_4 -quitosana), utilizando como agente bifuncional o glutaraldeído por formação de bases de Schiff. A lipase de pâncreas de porco foi imobilizada em esferas de quitosana ativada por glutaraldeído (DESAI et al., 2006). A quitosana em esferas ativada pelo método binário que utiliza dois agentes bifuncionais, a carbodiimida e o glutaraldeído (TING et al., 2006) foi utilizada para a imobilização da lipase de *Candida rugosa* para a reação de hidrólise do óleo de soja e produção de biodiesel utilizando a combinação dos processos enzimáticos e químico (TING et al., 2008).

O carvão ativado é um material poroso natural, importante devido às suas propriedades adsorptivas. Sua principal característica física é a enorme área superficial interna, que é desenvolvida durante o processo de produção. Os adsorventes de carvão ativado são amplamente empregados para purificação de produtos como açúcar refinado, processamento de alimentos, tratamento de água e efluente e remoção de orgânicos voláteis nos processos industriais gasosos por ser um poderoso adsorvente. Sua grande área superficial e volume de poro permitem a remoção de contaminantes em fase líquida, incluindo compostos orgânicos, íons de metais pesados e corantes (HSIEH e TENG, 2000). Entretanto, a sua utilização na imobilização se transforma em uma opção vantajosa pelo baixo custo de produção, comparados com outros materiais utilizados como suportes. Este suporte tem sido utilizado na imobilização de lipases de diversos micro-organismos (KAEWTHONG et al., 2005; MENONCIN et al., 2009; RAMANI et al., 2010) e inclusive utilizado na imobilização de lipases para aplicação na produção de biodiesel (NARANJO et al., 2010; MORENO-PIRAJÀN; GIRALDO, 2011).

Celite é um material quimicamente inerte, impermeável, composto basicamente por SiO₂ amplamente utilizado para adsorção de enzimas por ser altamente poroso e barato (GHAMGUI et al., 2004; KAEWTHONG et al., 2005; CHANG et al., 2007; SATAR; HUSAIN, 2009). O uso do Celite tem crescido como bio-suporte por melhorar a velocidade de reação e proporcionar melhor distribuição do catalisador (SOUMANOU; BORNSCHEUER, 2003; SHA et al., 2004; CHANG et al., 2007; SHA; GUPTA, 2007; KUMAR; KANWAR, 2011).

Vários tipos de materiais para imobilização de lipase estão sendo desenvolvidos para aplicação na síntese de biodiesel. Liu et al. (2012b) desenvolveram partículas hidrofóbicas magnéticas a partir de uma solução de FeSO₄ e tetrasiloxano (TEOS) para imobilizar a lipase de *Burkholderiasp.* Nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ serviram como suporte para ligar covalentemente a lipase de *Thermomyces lanuginosa* (XIE; MA, 2010). Nanofibras de poliuretano produzidas por eletrospinning para imobilizar a lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LIU et al., 2012c).

A Tabela 3 apresenta alguns sistemas de produção de biodiesel a partir de diferentes matérias-primas, alcoóis, solventes e utilizando lipases comerciais ou não, livres ou imobilizadas e os rendimentos obtidos.

Tabela 3 – Sistemas biocatalíticos de produção de biodiesel

| Origem da lipase/ suporte | Solvente | Origem óleo | Álcool | Conversão (%) | Tempo (h) | Referência |
|--|-------------------|--------------------|---------------|----------------------|------------------|-------------------------------|
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Röhm G.m.b.H.) ¹ | Éter de petróleo | Girassol | Etanol | 80 | 5 | Mittelbach (1990) |
| <i>Pseudomonas cepacia</i> (Amano PS-30) ¹ / matriz filossilicato | - | Gordura | Etanol | 95 | 18 | Hsu et al. (2001) |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Amano Lipase AK) ¹ / kaolinita | - | Girassol | 1-propanol | ~100 | 25 | Iso et al. (2001) |
| <i>Candida antarctica</i> / resina acrílica (Novozym 435) ¹ | - | Algodão | Metanol | 91,5 | 7 | Köse et al. (2002) |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Amano)/ polipropileno | - | Girassol | Metanol | 90 | 24 | Soumanou; Bornscheuer; (2003) |
| <i>Chromobacterium viscosum</i> (Asahi Chemical Industry Co.)/celite | - | Pinhão-manso | Etanol | 71 | 8 | Sha et al. (2004) |
| <i>Candida antarctica</i> / resina acrílica (Novozym 435) ¹ | - | Farelo arroz | Metanol | 98 | 6 | Lai et al. (2005) |
| <i>Pseudomonas cepacia</i> (Amano) ¹ / TMSO* | - | Soja | Metanol | 67 | 1 | Noureddini et al. (2005) |
| <i>Pseudomonas cepacia</i> / terra diatomácea (Amano PS-D) ¹ | - | Trioleína | 1-butanol | 100 | 6 | Salis et al. (2005) |
| Lipase de pâncreas de porco (<i>Sigma</i>) ¹ / esferas quitosana | <i>n</i> -hexano | Salicórnia | Metanol | 55 | 12 | Desai et al. (2006) |
| Combinação de <i>Thermomyces lanuginosa</i> (Lipozyme TL IM-Novozymes) ¹ e <i>Candida antarctica</i> (Novozym 435) ¹ | <i>t</i> -butanol | Colza | Metanol | 95 | 12 | Li et al. (2006) |

Tabela 3 – Sistemas biocatalíticos de produção de biodiesel (continuação)

| | | | | | | |
|---|-------------------|---------------------------|--------------------|----------|--------|-------------------------|
| <i>Rhizopusoryzae/</i> BSPs** | - | Soja | Metanol | 75,5 | 29 | Hama et al. (2007) |
| <i>Pseudomonas cepacia/</i> Accurel | - | <i>Madhuca indica</i> | Etanol | 96 | 6 | Kumari et al. (2007) |
| <i>Pseudomonas cepacia/</i> PCMCs*** | - | <i>Madhuca indica</i> | Etanol | 99 | 2,5 | Kumari et al. (2007) |
| <i>Rhizopusoryzae/</i> BSPs | <i>t</i> -butanol | Soja | Metanol | 72 | 48 | Li et al. (2007) |
| <i>Candida antarctica/</i> resina acrílica (Novozym 435) ¹ | <i>t</i> -butanol | Algodão | Metanol | 97 | 24 | Royon et al. (2007) |
| <i>Pseudomonas cepacia</i> (Amano PS) ¹ / celite | - | Pinhão-manso | Etanol | 98 | 8 | Shah; Gupta (2007) |
| <i>Thermomyces lanuginosa</i> (Lipozyme TL IM-Novozymes) ¹ / hidrocalcita | - | Óleo de cozinha | Metanol | 92,5 | 105 | Yagiz et al. (2007) |
| <i>Candida rugosa</i> (Sigma) ¹ / esferas quitosana | - | Soja | Metanol | 99 | 12 | Ting et al. (2008) |
| <i>Pseudomonas Cepacia/</i> esferas de cerâmica (Sigma) ¹ | - | Óleo residual | Metanol | 40 | 25 | Al-Zuhair et al. (2009) |
| Lipase de pâncreas de porco(Sigma) ¹ | | Girassol | Etanol | 56 | 24 | Caballero et al. (2009) |
| Lipase de pâncreas de porco(Sigma) ¹ | 2-butanol | Girassol | Etanol | 65 | 24 | Caballero et al. (2009) |
| <i>Thermomyces lanuginosa</i> (Novo Nordisk) ¹ / matriz microporosa polimérica | - | Girassol Óleo residual | Metanol Metanol | 97 90 | 5 5 | Dizge et al. (2009) |
| <i>Candida rugosa</i> (Novozymes) ¹ revestida por surfactante não iônico | - | Óleo de semente de sebo | Metanol | 94 | 9 | Gao et al. (2009) |
| <i>Enterobacter aerogenes/</i> sílicamanso | <i>t</i> -butanol | Pinhão- | Metanol | 94 | 48 | Kumari et al. (2009) |

Tabela 3 – Sistemas biocatalíticos de produção de biodiesel (continuação)

| | | | | | | |
|--|------------------|---------|---------|------|----|------------------------|
| <i>Candida rugosa</i> (Sigma) ¹ / | <i>n</i> -hexano | Óleo de | Metanol | 72,3 | 48 | Nasratun et al. (2009) |
|--|------------------|---------|---------|------|----|------------------------|

| | | | | | | |
|--|-------------------|-----------------|------------|------|-----|--------------------------------|
| esferas quitosana | | cozinha | | | | |
| <i>Candida rugosa</i> (Sigma) ¹ | <i>n</i> -hexano | Óleo de cozinha | Metanol | 76,5 | 48 | Nasratun et al. (2009) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> /hidrotalcita | - | Colza | Metanol | 96 | 4,5 | Zeng et al. (2009) |
| <i>Candida</i> sp. 99-125/tecido | <i>n</i> -hexano | Arroz | Metanol | 87,4 | 10 | Li et al. (2010) |
| <i>Candida Antarctica</i> B (Novozym 435®)/ carvão ativado | - | Palma | Isobutanol | 100 | 40 | Naranjo et al.. (2010) |
| <i>Aspergillus</i> sp.(Flexo) ¹ /PCMCs | <i>t</i> -butanol | Palma | Etanol | 89,9 | 24 | Raita et al. (2010) |
| <i>Thermomyces lanuginosa</i> (Lipozyme TL IM-Novozymes) ¹ /nanopartículas magnéticas | - | Soja | Metanol | 94 | 30 | Xie; Ma (2010) |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> /tecido | - | Soja | Etanol | 85 | 3 | Meng et al. (2011) |
| <i>Candida rugosa</i> (Amano) ¹ /carvão ativado | - | Palma | Metanol | 70 | 1 | Moreno-Piraján; Giraldo (2011) |
| <i>Burkholderia</i> sp/partículas hidrofóbicas magnéticas | - | Palma | Etanol | 85 | 1 | |
| <i>Burkholderia</i> sp/partículas hidrofóbicas magnéticas | - | Oliva | Metanol | 70 | 12 | Liu et al. (2012b) |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Amano Lipase AK) ¹ / nanofibras | Isooctano | Soja | Metanol | 91 | 2 | Liu et al. (2012c) |
| <i>Candida rugosa</i> (Sigma) ¹ /esferas quitosana magnéticas | <i>n</i> -hexano | Soja | Metanol | 87 | 30 | Xie; Wang (2012) |

Fonte: próprio autor

¹Fornecedor/ empresa da enzima *Tetrametoxissilano **Partículas cúbicas de espuma de poliuretano como suporte de imobilização de biomassa

***microcristais de proteína

3.4.3 Biossensores

As enzimas imobilizadas também são utilizadas para aplicações analíticas em biossensores que são construídos pela integração de sinais biológicos com transdutores. Os biossensores são capazes de obter sinal químico produzido pela interação de um sistema biológico com um analito e traduzí-lo em uma resposta mensurável. Os sinais gerados podem ser direta ou inversamente proporcionais à concentração do analito (STARODUB, 2006; SASSOLAS et al., 2012).

Os biossensores são divididos de acordo com o tipo de transdutor, podendo ser eletroquímicos (macro eletrodos planares), mecânicos (micro balança de quartzo), ópticos (fibras ópticas), calorimétricos (com termistores) e magnéticos. Os transdutores eletroquímicos são amplamente utilizados, por sua vez, são divididos em potenciométricos, amperométricos, condutométricos e impedancimétricos, sendo os dois primeiros os mais utilizados (STARODUB, 2006; SASSOLAS et al., 2012). Ainda, são divididos de acordo com três gerações, podendo ser de primeira, onde o produto normal da reação difunde para o transdutor que causa a resposta elétrica; de segunda, que envolve mediadores entre a reação e o transdutor, a fim de gerar uma melhor resposta, e de terceira geração, que surge da natureza do sensor, onde a própria reação provoca a resposta e nenhum produto ou mediador de difusão está diretamente envolvido (AHUJA et al., 2007).

As enzimas são normalmente imobilizadas na ponta de um eletrodo de trabalho ou é envolvida em algum material que a prenda firmemente. A enzima imobilizada deve manter sua estrutura, função, atividade catalítica e não ser desativada durante o uso do biossensor. Vários métodos de imobilização podem ser empregados tais como adsorção, ligação cruzada, ligação covalente, confinamento (AHUJA et al., 2007; SASSOLAS et al., 2012).

Vários materiais podem ser utilizados para a construção de biossensores eletroquímicos. Materiais à base de carbono, como nanotubos de carbono, pasta de carbono são amplamente utilizados. Estes materiais são altamente inertes, possuem uma ampla janela de potencial em solução aquosa, estrutura cristalina que permite baixa corrente de residual, alta relação sinal-ruído, além de ter baixo custo (AHUJA et al., 2007). A pasta de carbono é constituída por uma mistura de pó de grafite e um agente aglutinante, como por exemplo, Nujol[®], Uvasol, Parafina, Bromonaftaleno, que devem ser eletroinativos, quimicamente

inertes, imiscíveis em água, pouco voláteis e apresentar baixo teor de impurezas (AHAMMAD et al., 2009; ZIMA et al., 2009). Outros materiais também utilizados são filmes poliméricos, quitosana, silicone, partículas magnéticas (REDDY et al., 2001; FERNANDES et al., 2008; PUNDIR et al., 2010; SASSOLAS et al., 2012).

Biossensores utilizando lipases imobilizadas são eficientes e precisos na determinação quantitativa de triacilglicerol, importante para a indústria alimentícia, especialmente de óleo e gorduras, bebidas e refrigerantes. Esta aplicação também é importante para a indústria farmacêutica e no diagnóstico clínico. Glicerol é gerado a partir do triacilglicerol da amostra e então é quantificado. Lipases imobilizadas também foram utilizadas na detecção de pesticidas organofosforados e de tributirina (REDDY et al., 2001; HASAN et al., 2006; KARTAL et al., 2007; REJEB et al., 2007; MINAKSHI; PUNDIR, 2008; PUNDIR et al., 2010).

Minakshi e Pundir (2008) desenvolveram um sensor amperométrico a partir da mistura de três enzimas imobilizadas covalentemente em uma membrana de acetato de celulose para a determinação enzimática de triglicerídeos. Foi construído utilizando as enzimas lipase, glicerol quinase e glicerol-3-fosfato oxidase imobilizadas, sobre um eletrodo de platina (eletrodo de trabalho), conectado ao potenciostato, juntamente com o eletrodo de referência (Ag/AgCl) e eletrodo auxiliar (Ag). O biossensor mediu os elétrons gerados a partir do H_2O_2 que foram formados da trioleína ou triglicerídeos pelas enzimas imobilizadas sob um potencial de 0,4 V. O eletrodo de enzima mostrou ótima resposta quando operado a 25 °C e em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,5, durante 40 s.

Pundir et al. (2010) pela combinação de quatro enzimas imobilizadas em membrana de álcool polivinílico desenvolveram um biossensor amperométrico para quantificação do colesterol. As enzimas utilizadas foram lipase, glicerol quinase e glicerol-3-fosfato oxidase e peroxidase. O sensor mostrou uma resposta ótima dentro de 2 s a pH 7,0 e 25 °C.

Um biossensor potenciométrico utilizando a lipase de *Candida rugosa* foi construído para a detecção de pesticidas organofosforados, paration metílico e tributirina. A lipase foi imobilizada no eletrodo de vidro através de uma membrana gelatinosa por ligação cruzada (KARTAL et al., 2007).

A atividade de lipase contra triacilgliceróis foi medida utilizando um biossensor amperométrico baseado na co-imobilização das enzimas glicerol desidrogenase e NADH oxidase. O primeiro passo da análise consiste na hidrólise

do triacilglicerol a glicerol e ácidos graxos na presença da lipase. O segundo passo é a determinação do glicerol produzido pelas duas enzimas imobilizadas (REJEB et al., 2007).

A lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada em um filme de cério nanoestruturado depositado sobre uma placa de vidro revestida com óxido de índio-estanho (ITO- indium-tin-oxide) para detecção de tributirina. A resposta eletroquímica do bioeletrodo exibiu linearidade, limite de detecção e vida útil de 50-500 mg/dL, 32,8 mg/dL e 12 semanas, respectivamente, além de alta afinidade da enzima pela tributirina e tempo de resposta de 20 s (SOLANKI et al., 2009).

Os biossensores têm se tornado uma ferramenta importante para a detecção de vários componentes químicos e biológicos com alta especificidade e fácil manuseio. Esses sistemas têm como vantagens baixo custo, pequeno porte e “design” simples (SASSOLAS et al., 2012). Além disso, em alguns casos possuem a vantagem de rapidez e sensibilidade em relação às técnicas tradicionais (REJEB et al., 2007).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Tortas Vegetais

A torta de soja foi gentilmente doada pela IMCOPA (Cambé-PR, Brasil) e a torta de mamona foi adquirida de Remy Comércio e Beneficiamento de Mamona (Londrina-PR, Brasil).

4.1.2 Glicerol

O glicerol residual proveniente da produção de biodiesel foi fornecido pela BIOPAR – BIOENERGIA DO PARANÁ LTDA (Rolândia-PR, Brasil). O Glicerol PA foi adquirido de FMaia Indústria e Comércio LTDA (Cotia-SP, Brasil)

4.1.3 Suportes e Ativadores

Foram utilizados como suportes para a imobilização de lipase carvão ativado de coco (GAC-LB) e madeira (GAC-LC) Crosscarbo 12 x 40 (Cross FilterBrasil Ltda.); Celite 545[®] e quitosana de baixo peso molecular com grau de desacetilação maior ou igual a 75% (cod. 448869) de Sigma Aldrich (EUA) e grafite adquirido de Fluka Analytical (EUA).

Os agentes de ativação utilizados foram o glutaraldeído 50% (Fluka Analytical, EUA) e N - (3-dimetilaminopropil) – N' – etilcarbodiimida (EDC, C₈H₁₇N₃.HCl), adquirido de Sigma Aldrich (EUA).

4.1.4 Substratos

Foram utilizados como substratos para a atividade hidrolítica de lipase os ésteres de *p*-nitrofenila (acetato, butirato, caproato, caprato, palmitato e estearato) adquiridos de Sigma-Aldrich (EUA).

Para a produção de biodiesel foi utilizado óleo de soja Sinhá, doado por Caramuru Alimentos S.A. (Apucarana-PR).

Para a produção doseletrados modificados foram utilizados como substratos palmitato de *p*-nitrofenila, óleo de soja Liza (Cargil Agrícola S/A) e azeite de oliva Andorinha (Sociedade Portuguesa de Azeites S/A).

4.1.5 Biodiesel Padrão

O biodiesel utilizado como padrão foi fornecido pela BIOPAR – BIOENERGIA DO PARANÁ LTDA. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.1.6 Meios de Cultivo

Os meios de cultivo utilizados rotineiramente no decorrer deste trabalho foram o meio BDA (Tabela 4), meio mínimo de sais de Vogel (1956) (Tabela 5) e o meio VGA (Tabela 6), descritos abaixo:

Tabela 4 – Meio BDA (Batata Dextrose Agar)

| | |
|--------------------|--------|
| Batata | 20 g |
| Dextrose | 2 g |
| Ágar | 1,5 g |
| Água destilada qsp | 100 mL |

Fonte: próprio autor

Tabela 5 – Meio mínimo de sais de Vogel*

| | | | | |
|--|---------|-------------------------------------|--|--------|
| Citrato de sódio. 5 ½ H ₂ O | 150 g | Solução de Elementos-traços: | Ácido cítrico. 1 H ₂ O | 5 g |
| KH ₂ PO ₄ anidro | 250 g | | ZnSO ₄ . 7 H ₂ O | 5 g |
| NH ₄ NO ₃ anidro | 100 g | | Fe(NH ₄) ₂ . 6 H ₂ O | 1 g |
| MgSO ₄ . 7 H ₂ O | 10 g | | CuSO ₄ . 5 H ₂ O | 0,25 g |
| CaCl ₂ . 2 H ₂ O | 5 g | | MnSO ₄ . 1 H ₂ O | 0,05 g |
| Solução de elementos-traços | 5 mL | | H ₃ BO ₃ anidro | 0,05 g |
| Solução de biotina 0,1 mg/mL | 2,5 mL | | Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O | 0,05 g |
| Água destilada qsp. | 1000 mL | | Água destilada qsp. | 100 mL |

Fonte: próprio autor

* Concentrado 50 vezes

Tabela 6 – Meio VGA (Vogel, Glucose e Ágar)

| | |
|---|--------|
| Meio mínimo de sais de Vogel (50 vezes concentrado) | 2 mL |
| Glucose | 1 g |
| Ágar | 2 g |
| Água destilada qsp | 100 mL |

Fonte: próprio autor

4.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Todos os experimentos foram realizados no mínimo em triplicatas, exceto pelos planejamentos fatoriais desenvolvidos com triplicata somente no ponto central e os resultados estão expressos por suas médias.

4.2.1 Micro-organismo e Cultivo

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi *Botryosphaeria ribis* EC-01 (GenBank Accession Number DQ852308) que foi mantido em BDA inclinado (meio de manutenção), à temperatura de $4,0 \pm 2$ °C e repicados trimestralmente. *B. ribis* EC-01 foi transferido do meio de manutenção para placas de Petri contendo meio de VGA, que foram incubadas a 28 ± 2 °C por 5 dias (Figura 10).

Figura 10– *Botryosphaeria ribis* EC-01 crescido em VGA (Vogel-Glucose-Agar) após 5 dias de cultivo a 28 ± 2 °C

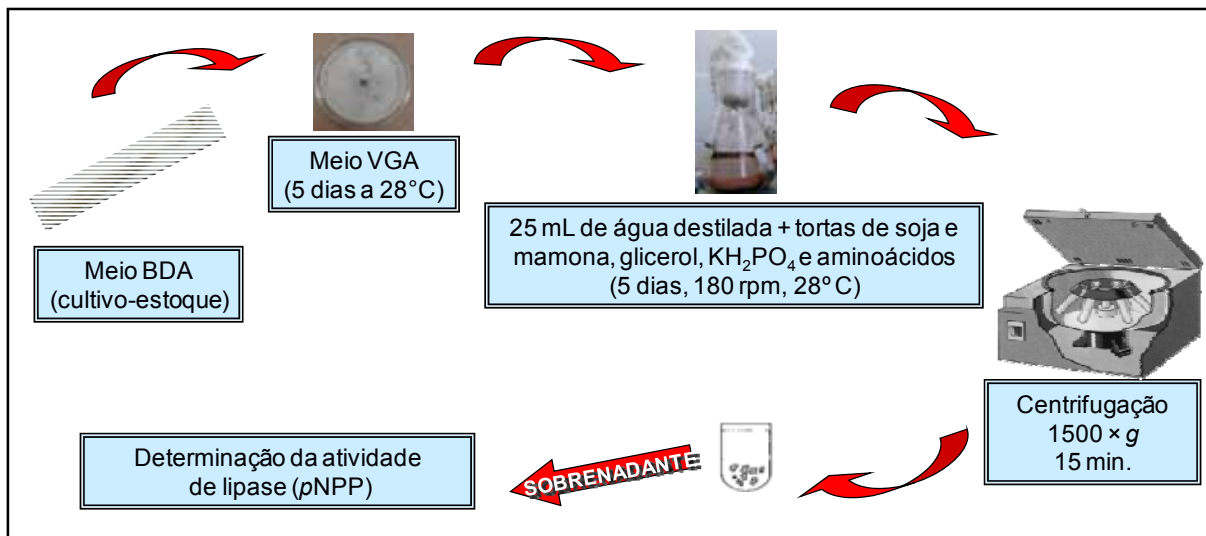


Fonte: próprio autor

Na etapa de otimização da produção de lipase por *B. ribis* EC-01, após o tempo de crescimento, quatro esferas (0,7 cm de diâmetro com peso seco = 0,0391g) foram retiradas da placa colonizada contendo hifas homoganeamente distribuídas e usadas para inocular frascos de Erlenmeyer de 125 mL. Os frascos continham 25 mL de meio líquido das tortas de soja e mamona em água destilada, com ou sem adição de outros reagentes, descritos a seguir. Os cultivos foram incubados a 28 ± 2 °C, por 120 h, sob agitação constante de 180 rpm. Decorrido 5, os cultivos foram interrompidos por centrifugação ($1500 \times g/15$ min) e os

sobrenadantes recuperados foram utilizados como extrato bruto de lipase (EB). A Figura 11 apresenta um esquema da produção e obtenção do EB.

Figura 11 – Esquema da produção e separação da lipase produzida por *Botryosphaeria ribis* EC-01



Fonte: adaptado de MESSIAS (2008).

Na etapa de produção em grande escala, após a otimização, semelhantemente, dezesseis esferas cotendo hifas homogêneas(0,1564g) foram utilizadas para inocular frascos Erlenmeyer de 2 L contendo 400 mL de meio. O meio era composto por água destilada e 2,37% (m/v) de torta de soja e 4,5 % (v/v) de glicerol PA, que foi mantido a 28°C, por 120 h, sob agitação constante de 180 rpm. Decorridos cinco dias, os cultivos foram interrompidos por filtragem a vácuo. Os sobrenadantes recuperados, após diálise de 48 h com água deionizada foram liofilizados por 72h. A partir deste liofilizado soluções enzimáticas foram preparadas e congeladas para posterior aplicação do EB na produção do biodiesel e imobilização nos diversos suportes testados na reação de transesterificação.

4.2.2 Produção de Lipase por *Botryosphaeria Ribis* EC-01

4.2.2.1 Efeito da concentração de torta de soja

A torta de soja foi analisada nas concentrações de 0,5 a 6 % (m/v) como substrato para a produção de lipase por *B. ribis* EC-01 com adição somente de água.

4.2.2.2 Efeito da adição de aminoácidos

Os aminoácidos serina, glicina, histidina, ácido glutâmico e ácido aspártico foram adicionados separadamente ao meio líquido contendo 1% (m/v) de torta de soja e examinados como substrato para a produção de lipases por *B. ribis* EC-01, em concentrações que variaram de 0,01 a 0,5% (m/v).

4.2.2.3 Efeito das fontes de fosfato

O efeito da adição de fosfato na produção de lipases foi examinado adicionando KH_2PO_4 ou K_2HPO_4 (0,5%, m/v) ao meio líquido contendo 1% (m/v) de torta de soja.

4.2.2.4 Efeito das combinações das tortas de soja e mamona e adição de glicerol

A torta de soja foi combinada com a torta de mamona com concentração final de 1 % (m/v) nas seguintes proporções 1:1, 1:3 e 3:1. A adição de glicerol-PA e glicerol residual (GR) a 2 e 4 % (v/v) foi avaliada na proporção das tortas de soja e mamona de 3:1.

4.2.2.5 Planejamento fatorial e análise por metodologia superfície de resposta (MSR) para a produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01

Depois de selecionadas as variáveis que influenciaram positivamente a produção de lipase por *B. ribis* EC-01, os parâmetros para o melhoramento da produção de lipases foram estudados por planejamentos estatísticos, do tipo fatorial 2^k , com k fatores ou variáveis, todos com dois níveis.

4.2.2.5.1 Tratamento I

Um planejamento fatorial 2^4 (19 experimentos), avaliando-se as concentrações de torta de soja (X_1), torta de mamona (X_2), glicerol PA (X_3) e KH_2PO_4 (X_4), de acordo com Tabela 7, que indica os níveis inferiores (-1), centrais (0),

superiores (+1). O meio nutriente foi composto por água destilada e os fatores (X_1 - X_4).

Tabela 7 – Níveis de variação para os fatores do planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central para avaliação da produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01

| Fatores | Níveis reais e codificados | | |
|-----------------------------|----------------------------|------|-----|
| | -1 | 0 | +1 |
| X_1 torta soja (% m/v) | 0,5 | 1,5 | 2,5 |
| X_2 torta mamona (% m/v) | 0 | 0,25 | 0,5 |
| X_3 glicerol - PA (% v/v) | 0 | 3 | 6 |
| X_4 KH_2PO_4 (% m/v) | 0,1 | 0,35 | 0,6 |

Fonte: próprio autor

4.2.2.5.2 Tratamento II

Um segundo planejamento 2^2 foi desenvolvido com pontos axiais ($\pm\alpha$, com $\alpha = (2^k)^{1/4}$) totalizando 11 experimentos, baseado nos resultados obtidos com o Tratamento I. A Tabela 8 apresenta o planejamento realizado com os níveis inferiores (-1), centrais (0), superiores (+1) e também os axiais ($\pm 1,41$), que vão além dos inferiores e superiores. A configuração estrela se dá pelo incremento destes pontos axiais, gerando os níveis no formato de uma estrela (Barros, 2003). Os fatores estudados foram a concentração de torta de soja (X_5) e glicerol PA (X_6).

Tabela 8 – Níveis de variação para os fatores do planejamento fatorial 2^2 adicionado de pontos axiais e centrais para avaliação da produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01

| Fatores | Níveis reais e codificados | | | | |
|---------------------------|----------------------------|-----|-----|-----|-------|
| | -1,41 | -1 | 0 | +1 | +1,41 |
| X_5 torta soja (% m/v) | 0,7 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 3,3 |
| X_6 glicerol-PA (% v/v) | 1,0 | 2,0 | 4,5 | 7,0 | 8,0 |

Fonte: próprio autor

Os resultados experimentais dos planejamentos fatoriais desenvolvidos foram ajustados em uma equação polinomial (1) pela técnica de regressão múltipla, onde Y é a resposta preditiva de atividade de lipase e é uma variável dependente, x_i e x_j são variáveis independentes codificadas e β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} são coeficientes constantes.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i<j} \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

As equações polinomiais lineares (equação 9 – seção 5.1.5) e quadráticas (equação 10, 11, 12 – seção 5.1.5) foram ajustadas para correlacionar a variável resposta. As melhores condições foram previstas pelas equações de segundo grau. Os coeficientes de regressão (R^2) foram utilizados para expressar a qualidade do ajustado dos modelos polinomiais e a significância estatística foi determinada pelo teste-F.

Análises de variância (ANOVA) e de regressão múltipla foram realizadas ao nível de 5 % de significância utilizando o programa STATISTICA Version 8.0®.

4.2.3 Determinação da Concentração de Proteínas

A concentração de proteínas extracelulares da lipase produzida foi determinada pelo método de Bradford (1976). A albumina de soro bovino foi utilizada como padrão para construção de uma curva analítica (0 – 250 mg/mL).

4.2.4 Determinação da Atividade de Lipase Livre e Imobilizada

A atividade da lipase livre e imobilizada foram determinadas utilizando palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) como substrato (WINKLER; STUKMANN, 1979), baseado na hidrólise do *p*NPP, em meio aquoso, contendo Triton X-100 como surfactante. A liberação *p*-nitrofenol pela ação da lipase é quantificada através da absorvância da coloração amarela no comprimento de onda de 410 nm.

A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8) a 55°C por 2 minutos. A absorvância, medida em 410 nm, o coeficiente de extinção molar para o *p*NP: $1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi utilizado para correlacionar a concentração do produto com a absorvância obtida na leitura (MESSIAS et al., 2009). Uma unidade de atividade de lipase foi definida como 1 μmol de *p*NP (*p*-nitrofenol), liberado por minuto por mL da solução da enzima.

Ensaio de atividade também foram realizados com outros ésteres de *p*NP (acetato, butirato, caproato, caprato e estearato) para avaliação da especificidade de substrato da lipase de *B. ribis*EC-01.

O procedimento e o cálculo utilizado para a determinação da atividade estão descritos abaixo.

a) Solução A: palmitato de *p*-nitrofenila (ou outros ésteres de *p*-nitrofenila) em isopropanol, em uma concentração de 3,0 mg/mL;

b) Solução B: 2 g de Triton X-100 dissolvidos em 450 mL de tampão fosfato 0,05 mol/L, pH 8,0.

1 mL da solução A foi adicionada em 10 mL da solução B. A mistura reativa foi produzida, imediatamente à determinação da atividade, considerando que o substrato é instável. Em banho termostático na temperatura ótima de 55 °C para a atividade da lipase, 0,9 mL da mistura foi adicionado em tubo de ensaio e em seguida, 0,1 mL do extrato enzimático também foi adicionado. Para o controle da reação foi utilizado 0,1 mL de água destilada, no lugar do extrato enzimático. Decorrido dois minutos de reação, a leitura da atividade foi efetuada a 410 nm.

Para a enzima imobilizada foi utilizado 1 mg da enzima imobilizada nos suportes 1 esfera (0,025 g), incubação com agitação, também a 55 °C e interrupção por filtração em papel filtro qualitativo. Para cada análise foi realizado um controle utilizando 1 mg do suporte ou 1 esfera sem enzima.

Para o cálculo da atividade enzimática livre e imobilizada foi utilizada a fórmula geral:

$$\frac{U}{\text{mL ou } U/g} = \left[\frac{Abs}{s} \times \frac{1}{V_e \text{ ou } \frac{m_g}{11} V_{sol}} \times \frac{1}{E_r} \times DF \times 10^5 \right] \quad (2)$$

Em que:

U/mL: unidade de atividade enzimática da solução da enzima, definida de acordo com o método utilizado, nas condições padrão de ensaio;

U/g: unidade de atividade enzimática da enzima imobilizada por grama de suporte, definida de acordo com o método utilizado, nas condições padrão de ensaio;

Abs: absorvância a λ (nm);

ϵ : coeficiente de extinção molar ($M^{-1}.cm^{-1}$);

V_e : volume de enzima utilizado no ensaio (mL);

V_{sol} : volume utilizado para a reação com a enzima imobilizada (mL);

m_e : massa de enzima utilizada no ensaio (g)

t_r : tempo de reação (minutos);

DF: fator de diluição

10^3 : fator de conversão de mol/L para $\mu\text{mol/mL}$.

O procedimento de quantificação da atividade de lipase descrito acima foi adotado durante todo o trabalho, sendo esta a condição padrão de análise de atividade enzimática.

4.2.5 Determinação de Parâmetros Físico-Químicos e Cinéticos da Lipase Livre de *Botryosphaeria ribis* EC-01

4.2.5.1 Temperatura e pH ótimos da lipase livre

Os efeitos da temperatura e pH na atividade da lipase foram avaliados utilizando pNPP como substrato. O extrato bruto de lipase (EB) foi incubado com diferentes sistemas de tampões (3 a 10) na concentração de 0,05 mol/L: citrato-fosfato (pH 3-7), fosfato de sódio (pH 6- 8), tris/HCl (pH 8-9), ácido bórico-boráx (pH 8-9) e glicina-NaOH (pH 9-10), durante 2 minutos a 55 °C. Após a determinação do pH ótimo, o EB foi incubado em pH 8 (tampão fosfato de sódio 0,05M) em temperaturas na faixa de 30 a 65 °C com intervalos de 5 °C, durante 2 minutos e 55 °C.

4.2.5.2 Estabilidade térmica e em diferentes pH da lipase livre

O EB (1 mL) foi incubado nas seguintes temperaturas: 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70 e 80 °C em intervalos de tempo de 5 min a 3 h. Para as temperaturas

entre 30 e 55°C, foi considerado um intervalo de 96 h. Nos intervalos de tempodeterminados, alíquotas (0,1 mL) foram removidas e ensaiadas na condição padrão. A influência do pH na estabilidade da enzima foi avaliada incubando-se o EB durante 1 h a 30 °C, na proporção 1:1 nos diferentes tampões descritos no item 4.2.5.1, e também na mesma proporção, com água destilada. Em seguida, alíquotas foram removidas (0,1 mL), diluídas em água destilada quando necessário e ensaiadas na condição padrão.

4.2.5.3 Efeito de sais metálicos, detergentes e solventes orgânicos na lipase livre

Um mL do EB foi incubado em diferentes soluções de sais metálicos (proporção 1:1) dos cátions: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} na concentração de 1, 5, 10, 25, 50 e 100 mmol/L a 30°C por 1h. Da mesma forma, o EB foi incubado a 30°C por 1h na proporção 1:1 com os surfactantes Tween 80, SDS (dodecil sulfato de sódio) e Triton X-100 na concentração de 0,01 % (m/v). Em seguida, alíquotas (0,1 mL) foram removidas, diluídas em água destilada quando necessário e ensaiadas na condição padrão.

A estabilidade em solventes orgânicos foi avaliada através do método proposto por Sztajer et al. (1992), exceto pela temperatura de incubação, que foi de 30°C. Os solventes avaliados foram: acetona, butanol, isopropanol, hexano, e tolueno (99,3 %, v/v); etanol e metanol (1, 2, 5, 10, 25, 50 e 99,3%, v/v). Além do glicerol na concentração de 50,0 % (v/v). A atividade residual de lipase foi ensaiada na condição padrão.

4.2.5.4 Parâmetros cinéticos da lipase livre

A constante de Michaelis-Menten (K_{Map}) e a velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) do EB foi calculada pelo gráfico de Michaelis-Menten utilizando o programa GraphPad Prism v.5.03 for Windows, GraphPad Software. A enzima livre foi ensaiada na condição padrão com os ésteres de pNP (acetato, butirato, caproato, caprato, palmitato e estearato) em concentrações que variaram de 0,1 a 12 mM utilizando concentração do EB (100 μL) constante. A constante de desativação térmica (K_d) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) também foram determinados.

4.2.6 Imobilização da Lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01

O objetivo principal dos estudos de imobilização foi selecionar materiais que mantivessem a atividade enzimática e que também fossem estáveis termicamente e em solventes para possível aplicação na produção de biodiesel. Os suportes testados estão na Tabela 9, juntamente com o processo de ativação e imobilização empregados.

Tabela 9 – Suportes e métodos utilizados na imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01.

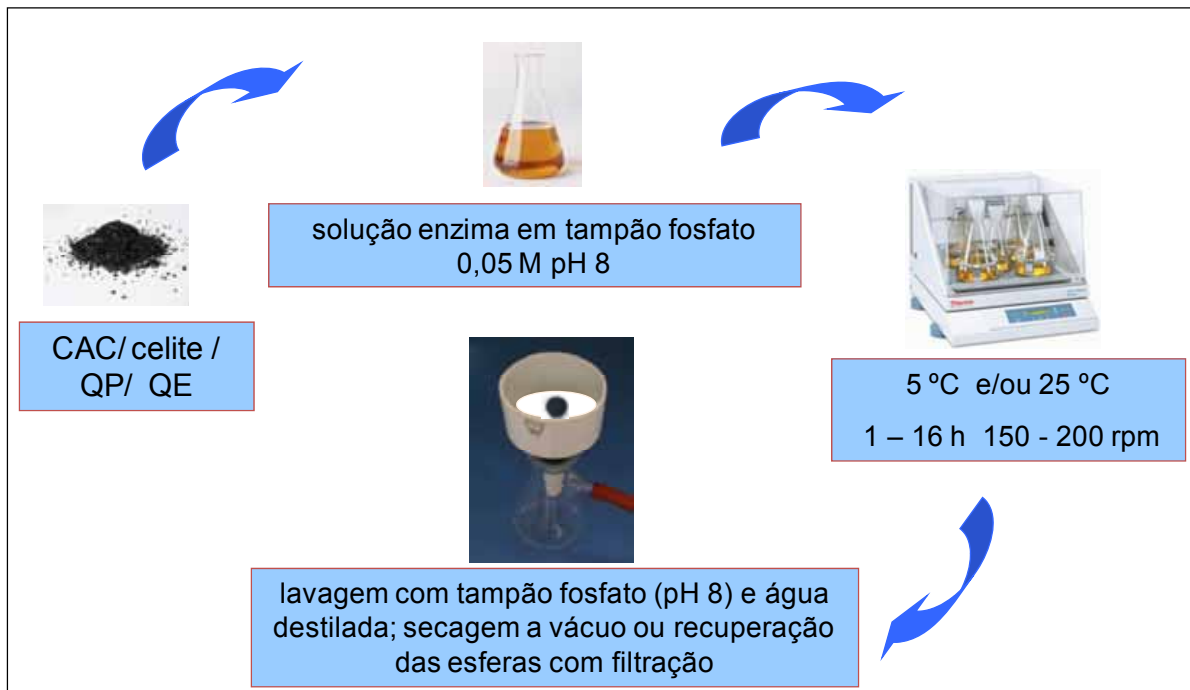
| Suporte | Composição/ natureza | Ativador | Tipo de imobilização |
|-------------------------|---|---|--|
| CAC ¹ | Carbono (principal) / Orgânico poroso | - GA ² EDC ³ + GA | Adsorção Ligação cruzada Ligação cruzada |
| Celite 545 [®] | Sílica (principal) / Inorgânico poroso | - | Adsorção |
| QE ⁴ | Polissacarídeo/ Orgânico poroso | GA EDC + GA | Ligação cruzada Ligação cruzada |
| QP ⁵ | Polissacarídeo/ Orgânico pouco poroso | GA EDC + GA | Ligação cruzada Ligação cruzada |

Fonte: próprio autor

¹Carvão Ativado de Coco; ²Glutaraldeído; ³N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida; ⁴Quitosana em Esferas; ⁵Quitosana em Pó

O esquema geral de imobilização adotado encontra-se na Figura 12. No caso da quitosana em esferas, existe uma etapa anterior de produção das esferas através do processo de gotejamento. E ainda, para a quitosana em esferas, quitosana em pó e também para o carvão ativado, quando foi utilizado agente ativador, existe o passo adicional de ativação. As imobilizações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 50 mL e a solução enzimática foi produzida pela solubilização da enzima liofilizada em tampão fosfato 0,05 M pH 8. As metodologias serão descritas a seguir.

Figura 12 – Esquema geral da imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01



Fonte: próprio autor

4.2.6.1 Seleção do carvão ativado de coco e madeira

Foram testados dois tipos de carvão ativado, o de coco (CAC) e o de madeira (CAM). A imobilização foi desenvolvida colocando-se em contato 1 g destes materiais com 50 mL de solução enzimática com concentrações de 1, 2 e 3% (v/v). Essas soluções utilizadas na imobilização possuíam atividade enzimática de 5,4; 14,2 e 20,5 U/g_{suporte}, respectivamente e proteína 0,61; 1,45 e 2,59 mg de proteína por g de suporte, respectivamente. A mistura foi mantida em agitador orbital a 150 rpm nas temperaturas de 5 e 25°C por 16h. Em determinados tempos de 30, 60, 90 minutos e 3, 6 e 16 h, alíquotas de 500 µL do sobrenadante foram retiradas para determinação de proteínas e atividade enzimática. O derivado imobilizado foi lavado duas vezes com tampão fosfato pH 8,0 (0,2 M) seguido de água destilada e seco a vácuo por 16h. A atividade enzimática e proteína também foram determinados nas águas de lavagem. Os resultados foram avaliados estatisticamente por ANOVA e teste de Tukey ao nível de 5% de significância (OriginPro v. 8.0, OriginLab Corporation USA).

4.2.6.2 Imobilização da lipase em Celite

A imobilização da lipase de *B. ribis* EC-01 em Celite foi realizada colocando em contato 0,5 g de Celite com 10 mL de solução enzimática (208 U/g-suporte e 3,74 mg proteína/g-suporte). A mistura foi mantida em agitador orbital (200 rpm) à temperaturas de 5 e 25 °C. Em intervalos de tempo de 1 e 16h, os frascos Erlenmeyer foram retirados e o conteúdo filtrado à vácuo para recuperação do sobrenadante e do biocatalisador. O Celite contendo a enzima imobilizada foi lavado duas vezes com tampão fosfato pH 8 (0,2 M), seguido de lavagem com água destilada e seco à vácuo por aproximadamente 16 h.

A atividade enzimática foi determinada no derivado, no sobrenadante e na solução inicial de enzima. O teor de proteínas foi determinado na solução inicial e no sobrenadante.

4.2.6.3 Imobilização da lipase em quitosana

A imobilização da lipase de *B. ribis* EC-01 com quitosana foi realizada com a quitosana em esferas (QE) produzidas por gotejamento em solução básica e também com a quitosana em pó (QP), sua forma comercializada.

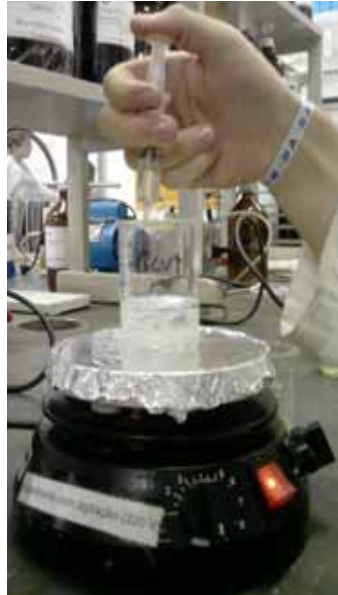
4.2.6.3.1 *Produção das esferas de quitosana*

Para a produção das esferas de quitosana que foram ativadas somente com glutaraldeído adaptou-se o método proposto por Adriano et al (2005), onde 1 g quitosana em pó foi diluído em 30 mL de solução de ácido acético 5% (v/v). A solução espessa obtida foi gotejada em solução de NaOH 1 M com auxílio de uma seringa, como ilustra a Figura 13. Terminado o gotejamento, as esferas obtidas ficaram em banho de precipitação por 16 h e, após esse período, foram lavadas com água deionizada até total neutralidade e secas ao ar.

Semelhantemente, as esferas de quitosana para ativação com glutaraldeído e EDC (N - (3-dimetilaminopropil) – N' – etilcarbodiimida) pelo método binário (Ting et al., 2006) foram produzidas pelo gotejamento em uma solução NaOH 1 M contendo 26% (v/v) de etanol. A solução a ser gotejada por uma seringa foi composta de 3 % (m/v) de quitosana diluída em 1 % (v/v) de ácido acético. As

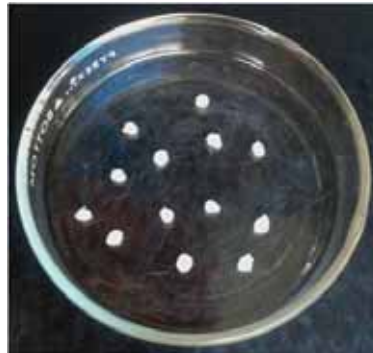
esferas produzidas ficaram durante uma noite em banho de precipitação e logo em seguida foram lavadas com água deionizada até neutralidade. A Figura 14 ilustra as esferas obtidas.

Figura 13 – Produção das esferas de quitosana pelo gotejamento da solução



Fonte: próprio autor

Figura 14 – Esferas de quitosana produzidas



Fonte: próprio autor

4.2.6.3.2 *Funcionalização e imobilização da quitosana em esferas e em pó com glutaraldeído*

As esferas produzidas foram ativadas seguindo método proposto por Adriano et al (2005), com algumas modificações: 40 esferas foram deixadas em contato com 5 mL de tampão fosfato pH 8 e 10 mL de soluções de glutaraldeído com concentrações de 1, 3 e 5 % (v/v), durante 24 h em agitador orbital a 25°C e 150 rpm.

Após esse tempo as esferas foram lavadas com água deionizada para remoção do excesso do ativador e armazenadas para posterior imobilização.

A imobilização da quitosana em esferas (QE) foi realizada em temperatura ambiente a 150 rpm durante 5 h, deixando-se em contato 20 esferas (0,5 g) ativadas nas diferentes concentrações de glutaraldeído em 10 mL de solução de lipase (210 U/g-suporte e 3,75 mg proteína/g-suporte). Em intervalos de tempo de uma hora, alíquotas (500 µl) do sobrenadante foram removidas para determinação de proteínas e atividade enzimática. Após 5 h as esferas foram recuperadas por filtração e lavadas duas vezes com tampão fosfato pH 8 (0,2 M), seguido de água destilada e secas à temperatura ambiente.

A quitosana em pó (QP) foi ativada e imobilizada seguindo o método proposto por Foresti e Ferreira (2007), com modificações. Para a ativação 0,4 g do material foi suspenso em 30 mL de soluções de glutaraldeído a 0,25 e 3% (v/v) em tampão fosfato pH 8 e mantidas em agitador orbital a 300 rpm e 25°C durante 30 min. Após este período, os suportes foram recuperados por filtração, lavados com água deionizada e estocados a 50°C durante 12 h.

A imobilização em QP foi conduzida durante 7 h a 300 rpm em temperatura ambiente pelo contato de 0,4 g do suporte ativado com 10 mL solução de lipase (235 U/g-suporte e 4,70 mg proteína/g-suporte). Após este período, o derivado imobilizado foi filtrado a vácuo, lavado duas vezes com tampão fosfato pH 8 (0,2 M), seguido de lavagem com água destilada e seco por 1 h a vácuo.

Nos dois casos, a atividade enzimática foi determinada no derivado, no sobrenadante e na solução inicial de enzima. O teor de proteínas foi determinado na solução inicial e no sobrenadante.

4.2.6.3.3 Funcionalização e imobilização da quitosana em esferas e em pó com glutaraldeído e carbodiimida (EDC)

A funcionalização pelo método binário proposto por Ting et al.(2006) utiliza não só o glutaraldeído mas também o agente de ativação EDC (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida). A ativação é realizada juntamente com a imobilização, sendo assim um método mais rápido e prático.

Na primeira etapa, a lipase foi imobilizada sobre os grupos hidroxila da quitosana por ativação com EDC. Na segunda etapa, mais moléculas de lipase

foram imobilizadas por seus grupos aminos a quitosana por ligação cruzada com o glutaraldeído. Uma quantidade de 0,3 g (QE) ou 0,25 g (QP) foi ativada com 3 mL de solução de EDC 0,25% (m/v) por 15 min de agitação (150 rpm) a 25°C. Decorrido este período os suportes foram filtrados e transferidos para Erlenmeyers contendo 3 mL de solução de lipase e deixados em contato por 1h em temperatura ambiente e 150 rpm. Depois de concluída a reação, o sobrenadante foi removido e 3 mL de glutaraldeído (GA) 0,005% (v/v) foi adicionado. Após 20 min. de contato em agitação lenta e temperatura ambiente, os suportes foram filtrados e 3 mL de lipase 1% (v/v) foi adicionado a eles para imobilização por 45 min. Finalmente, os imobilizados foram lavados em água deionizada, seguido de tampão fosfato pH 8, secos à vácuo (QP) ou ar (QE) e armazenados a 4 °C até utilização. A atividade enzimática e proteína oferecida para a reação com a QE foi de 210,3 U/g-suporte e 3,75 mg proteína/g-suporte. Para a QP foram oferecidos 226 U/g-suporte e 4,52 mg proteína/g-suporte.

4.2.6.4 Imobilização da lipase em carvão ativado de coco (CAC)

Após a seleção do carvão ativado, testes de imobilização envolvendo o passo de funcionalização com GA e EDC foram realizados, assim como a imobilização por adsorção, sem nenhum aditivo, para comparação.

A ativação com GA foi realizada deixando-se em contato 0,5 g do suporte com 5 mL de tampão fosfato pH 8 e 10 mL de solução de glutaraldeído 3 % (v/v), durante 24h em agitador orbital a 25°C e 150 rpm. Após esse tempo, o suporte foi lavado com água deionizada e armazenado para posterior imobilização.

A imobilização foi realizada deixando-se em contato 0,5 g do suporte ativado com 10 mL de solução enzimática sendo que a atividade enzimática oferecida foi de 195,3 U/g-suporte e a proteína 3,74 mg proteína/g-suporte. Os frascos permaneceram em agitador orbital a 150 rpm, 25 °C e 16 h.

O CAC também foi testado utilizando-se o método de imobilização binário de Ting et al. (2006), descrito acima. Neste caso, foi utilizado 0,25 g do suporte e atividade enzimática e proteína oferecida de 234 U/g-suporte e 4,49 mg proteína/g-suporte, respectivamente.

Juntamente com estes testes, o CAC foi imobilizado por adsorção nas melhores condições descritas no item 4.2.6.1 (5 °C e 30 min) pelo contato de 0,5

g do suporte com 10 mL solução enzimática (195,3 U/g-suporte e 3,74 mg proteína/g-suporte).

4.2.6.5 Equações utilizadas na imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01

A eficiência do processo de imobilização foi avaliada em termos de proteína ligada e rendimento de atividade, no sobrenadante e no imobilizado (HUNG et al., 2003; CHANG et al. (2007).

$$\text{Proteína ligada} = \text{Prot. oferecida} - \text{Prot. sobrenadante (após imobilização)} \quad (3)$$

$$\% \text{ proteína ligada} = \left(\frac{\text{Proteína ligada}}{\text{Proteína oferecida}} \right) \times 100 \quad (4)$$

$$\text{Eficiência de imobilização} = \left(\frac{A_i - A_f}{A_i} \right) \quad (5)$$

$$\text{Atividade de lipase} \left(\frac{\text{U}}{\text{g}} - \text{suporte} \right) = \frac{\text{Atividade da enzima imobilizada}}{\text{quantidade enzima imobilizada}} \quad (6)$$

$$\text{Atividade específica} \left(\frac{\text{U}}{\text{mg}} - \text{proteína} \right) = \frac{\text{Atividade da enzima imobilizada}}{\text{quantidade de proteína ligada}} \quad (7)$$

$$\text{Atividade específica relativa} = \left(\frac{\text{Atividade específica da enzima imobilizada}}{\text{Atividade específica enzima livre}} \right) \times 100 \quad (8)$$

4.2.7 Determinação de Parâmetros Físico-Químicos e Cinéticos da Lipase Imobilizada de *Botryosphaeria ribis* EC-01

Alguns parâmetros físico-químicos foram determinados nos imobilizados produzidos visando selecionar os suportes mais estáveis para aplicá-los na reação de transesterificação do biodiesel. Para a enzima imobilizada no suporte que obteve maiores rendimentos na produção de biodiesel, foi realizado o seu estudo cinético para determinação de seu K_{Map} e $V_{máx}$ frente a diversos substratos e também sua constante de desativação térmica (K_d) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$).

4.2.7.1 Estabilidade térmica da lipase imobilizada

50 mg do imobilizado ou três esferas (peso médio 0,0250 g) foram incubados nas seguintes temperaturas: 40, 45, 50, 55°C em um intervalo de tempo de 96 h a 200 rpm. A atividade residual de lipase foi ensaiada na condição padrão.

4.2.7.2 Efeito de solventes orgânicos e água na lipase imobilizada

A estabilidade em solventes orgânicos foi avaliada pela incubação de 50 mg do imobilizado ou três esferas em água, hexano (99,3 %, v/v); glicerol (50,0%, v/v); etanol, metanol e *t*-butanol (10, 25, 50 e 99.3%, v/v) a 25 °C por 1 h a 200 rpm. A atividade residual de lipase foi ensaiada na condição padrão.

4.2.7.3 Temperatura e pH ótimos da lipase imobilizada em Celite

Similarmente ao ensaio com a lipase livre, os efeitos da temperatura e pH na atividade da lipase imobilizada foram avaliados utilizando-se *p*NPP como substrato. O imobilizado (1 mg) foi incubado nos mesmos tampões descritos no item 4.2.5.1 e nas mesmas temperaturas (30 a 65°C), durante 2 minutos a 55 °C. Este ensaio foi realizado somente com a enzima imobilizada em Celite.

4.2.7.4 Parâmetros cinéticos da lipase imobilizada em Celite

A constante de Michaelis-Menten (K_{Map}) e a velocidade máxima ($V_{máx}$) foi calculada pelo gráfico de Michaelis-Menten utilizando o programa GraphPad Prism v.5.03 for Windows, GraphPad Software, Inc. A enzima imobilizada foi ensaiada na condição padrão com os ésteres de *p*NP (acetato, butirato, caproato, caprato, palmitato e estearato) em concentrações que variaram de 0,1 a 12 mM, utilizando concentração do imobilizado (1 mg) constante. A constante de desativação térmica (K_d) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) também foram determinados. Estes parâmetros foram determinados somente para o suporte que teve melhor desempenho na produção de biodiesel.

4.2.8 Caracterização do Suporte de Imobilização

4.2.8.1 Microscopia eletrônica de varredura

Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas nos suportes enos preparados enzimáticos imobilizados, com a finalidade de verificar possíveis alterações no suporte após a sua ativação, e utilização na imobilização da enzima. As análises foram realizadas em um microscópio PHILIPS-FEI modelo QUANTA 200. As amostras receberam um filme de ouro (± 20 nm) em equipamentosputter Coater modelo SCD 050 (BAL-TEC).Essa análise somente foi realizada nos imobilizados que foram utilizados na produção de biodiesel

4.2.8.2 Espectroscopia de absorção no infravermelho

Os preparados enzimáticos utilizados na produção de biodiesel, antes e após a imobilização, foram analisados por espectroscopia de absorção no infravermelho para verificação de possíveis alterações estruturais nos suportes. O equipamento utilizado foi Perkin ElmerFTIR/NIR SPECTROMETERMod. Spectrum Frontier com amostragem por ATR. O espectro de transmitância foi registrado entre 4000 e 400 cm^{-1} .

4.2.9 Produção de Biodiesel pela Lipase de *Botryosphaeria ribis*EC-01

4.2.9.1 Lipase livre

A reação de produção de biodiesel com a enzima livre foi desenvolvida conforme descrito por Chen et al. (2008), em um balão de três bocas redondo de fundo chato (250mL) em banho termostaticado, sob agitação magnética e acoplado em um sistema de refluxo (Figura 15). As misturas de reação incluíram 100 g de óleo de soja, água (10 % em peso do óleo), lipase livre de *B. ribis* EC-01 (200 U) e etanol. O etanol foi adicionado à reação em intervalos de 1h para reduzir o acúmulo de ação deletéria para a atividade da enzima. A quantidade de etanol de cada adição correspondeu a 1/8 da quantidade total. Alíquotas de 5 mL foram retiradas em tempos específicos (7, 24, 48, 72 e 96 h) e transferidas para funis de

separação e lavadas com água destilada (80 °C) três vezes. A camada superior resultante foi seca em placa aquecedora até total homogeneidade e então, analisada por Cromatografia Camada Delgada (CCD) e Cromatografia gasosa (CG). Quatro sistemas foram avaliados com duas temperaturas e duas razões óleo/álcool: A (50°C/1:9), B (50°C/1:18), C (45°C/1:9) e D (45°C/1:18).

Figura 15 – Sistema de refluxo utilizado na produção de biodiesel com a lipase livre de *Botryosphaeria ribis* EC-01



Fonte: próprio autor

Outro experimento com a enzima livre em frascos de Erlenmeyer (50 mL) foi conduzido utilizando 5g óleo de soja, água (0,5 %, m/v), lipase livre *B. ribis*EC-01 (300 U) e razão molar óleo de soja/ metanol de 1:5 sob agitação de 200 rpm a 50 °C durante 48 h. Este experimento foi realizado para verificar se a agitação orbital e a escala reduzida proporcionaria maiores rendimentos e consequentemente, redução dos reagentes utilizados.

4.2.9.2 Lipase imobilizada

Para a enzima imobilizada foi utilizado somente a agitação orbital (250 rpm) a 45 °C e tempo de 96 h. As misturas de reação incluíram 5 g de óleo de soja, água, lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em diversos suportes, metanol e *t*-butanol, de acordo com planejamentos fatoriais, exceto para o carvão ativado de

coco (CAC). O metanol foi adicionado à reação em intervalos de 1h para reduzir o acúmulo de ação deletéria para a atividade da enzima. A quantidade que foi adicionada a cada vez correspondeu a $\frac{1}{4}$ do total. Após o tempo de reação, as amostras foram centrifugadas para obtenção da camada superior (biodiesel) e analisadas por CG e CCD.

Os imobilizados empregados na produção de biodiesel foram aqueles que tiveram maiores rendimentos de imobilização e estabilidade frente às condições testadas de estabilidade térmica e em diferentes solventes. Os sistemas testados foram: a enzima imobilizada em CAC, Celite, QP ativada com 0,25 % de GA e QE ativada pelo método binário (Ting et al., 2006).

4.2.9.2.1 Lipase imobilizada em carvão ativo de coco

Os testes de produção de biodiesel envolvendo o CAC foram realizados com razão molar óleo/álcool de 1:6,6 com o metanol e etanol. A quantidade de enzima imobilizada utilizada foi de 250 mg.

4.2.9.2.2 Lipase imobilizada em quitosana em esferas e em pó

Para os experimentos de síntese de biodiesel utilizando a enzima imobilizada em quitosana em esferas e em pó, foi utilizado um planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central, totalizando 11 experimentos. Os níveis utilizados para o metanol (X_1), água (X_2) e *t*-butanol (X_3) se encontram na Tabela 10. A quantidade de enzima utilizada foi de 100 mg para a quitosana em pó ou 10 esferas de quitosana.

Tabela 10 – Níveis de variação para os fatores dos planejamentos fatoriais 2^3 com triplicata no ponto central para avaliação da produção de biodiesel pela lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em quitosana em esferas e em pó

| Variáveis | Níveis | | |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | -1 | 0 | +1 |
| X_1 metanol (mmol) | 28,3 (1:5) ^a | 33,9 (1:6) ^a | 39,5 (1:7) ^a |
| X_2 água (% m/v) | 0,5 | 2,5 | 4,5 |
| X_3 <i>t</i> -butanol (% m/v) | 8 | 10 | 12 |

Fonte: próprio autor

^a razão molar óleo:metanol

Análises de variância (ANOVA) e de regressão múltipla foram realizadas ao nível de 10 % de significância, utilizando o programa STATISTICA Version 8.0®.

4.2.9.2.3 Lipase imobilizada em Celite

A otimização da produção de biodiesel utilizando a enzima imobilizada em Celite foi realizada de acordo com um planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central, totalizando 11 experimentos. Os níveis de variação do metanol (X_4), água (X_5) e *t*-butanol (X_6) estão apresentados na Tabela 11. A quantidade de enzima imobilizada empregada foi 100 mg.

Análises de variância (ANOVA) e de regressão múltipla foram realizadas ao nível de 10 % de significância, utilizando o programa STATISTICA Version 8.0®.

Tabela 11 – Níveis de variação para os fatores do planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central para avaliação da produção de biodiesel pela lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em Celite

| Variáveis | Níveis | | |
|---------------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | -1 | 0 | +1 |
| X_4 metanol (mmol) | 16,9 (1:3) ^a | 25,4 (1:4,5) ^a | 33,9 (1:6) ^a |
| X_5 água (% m/v) | 2,5 | 5,0 | 7,5 |
| X_6 <i>t</i> -butanol (% m/v) | 10 | 20 | 30 |

Fonte: próprio autor

^arazão molar óleo:metanol

4.2.9.3 Análise dos ésteres de biodiesel por cromatografia em camada delgada

Preparou-se uma emulsão de sílica adicionando-se 12 gramas de sílica gel a 25 mL de água destilada, em almofariz de porcelana, misturando-se até obter uma pasta homogênea. A emulsão foi depositada em placas de vidro (10x10 cm) com a ajuda de um aplicador mecânico, obtendo-se uma camada sólida com 5 mm de espessura. As placas cromatográficas foram mantidas em estufa a 100°C até a sua utilização.

Foram preparadas soluções de padrão de ésteres de biodiesel na concentração de 1 mmol/L em éter etílico PA. Em seguida, aplicou-se com ajuda de

um capilar de vidro de 1 mm de diâmetro interno, uma gota de cada solução na placa, com distância de 2 cm entre cada aplicação e a uma distância de 2 cm da borda inferior da placa. Após a aplicação, as placas foram dispostas em cuba de vidro saturada com 80 mL de hexano, 20 mL de éter etílico e 10 mL de ácido acético glacial, permanecendo cerca de 20 minutos. As placas foram retiradas da cuba e levadas para estufa de revelação usando como revelador vanilina sulfúrica.

4.2.9.4 Análise dos ésteres do biodiesel por espectroscopia de absorção no infravermelho

O biodiesel foi analisado por espectroscopia de absorção no infravermelho em equipamento Shimadzu FTIR-8300. O espectro de transmitância foi registrado entre 4000 e 400 cm^{-1} a partir de um filme do biocombustível depositado entre placas de KBr.

4.2.9.5 Análise dos ésteres do biodiesel por cromatografia gasosa

O biodiesel produzido foi analisado quantitativamente em Cromatógrafo a gás Trace GC Ultra com detector FID (Thermo Scientific, Waltham, EUA) equipado com uma coluna DB-1 100% siloxano (J&W Scientific) 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm . A coluna foi aquecida a 120°C (30 s) e 220°C (1 min) a 30°C/min e então aumentada para 250 °C (10 °C/min) e mantida por 5 min. A temperatura do injetor e detector foi de 260°C e 280°C, respectivamente. As amostras foram diluídas em n-heptano e heptadecanoato de metila foi utilizado como padrão.

4.2.10 Eletrodos de Pasta de Carbono Modificados com a Lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01

A lipase de *B. ribis* EC-01 foi testada na confecção de eletrodos modificados de pasta de carbono. A pasta de carbono foi preparada pela mistura de 150 mg de pó de grafite e 50 μL de óleo mineral por 10 minutos, seguido da adição da lipase de *B. ribis* EC-01 e mistura por mais 20 minutos, quando a pasta ficou homogênea. Após o preparo da pasta, esta foi colocada na extremidade de uma seringa de plástico de 1 mL, modificada com um fio de cobre, acoplada ao embolo ligado para o contato elétrico externo a uma secção de grafite. O contato entre o fio

de cobre e a secção de grafite foi melhorado pela aplicação de uma tinta condutiva (Condumax plus). Dois eletrodos foram preparados, o de trabalho (EPC/lipase) e outro sem a presença da enzima (EPC). Foi utilizado o tampão fosfato pH 8 0,05 mol/L.

4.2.10.1 Medidas voltamétricas

As medidas de voltametria cíclica foram obtidas utilizando-se um potenciostato AUTOLAB. Um eletrodo de Ag/AgCl foi usado como referência e uma espiral de platina como contra eletrodo. O EPC/lipase foi o eletrodo de trabalho. Todas as medidas voltamétricas foram feitas em uma célula eletroquímica de vidro com capacidade para 25 mL, nas seguintes condições: velocidade de varredura igual a 50 mV s^{-1} e janela de potencial abrangendo de -0,45 a +0,5 V.

4.2.10.2 Avaliação do substrato

Concentrações crescentes (0,25-2 mL) de palmitato de *p*-nitrofenila, óleo de soja e azeite foram adicionados a 20 mL de tampão fosfato pH 8 (0,05 mol/L) na cela de reação. Estes substratos foram avaliados na funcionalidade do eletrodo de trabalho pasta de carbono (EPC) contendo a lipase de *B. ribis* EC-01. As soluções contendo óleo de soja e azeite foram sonicadas por no mínimo 20 minutos a fim de se obter uma mistura homogênea.

4.2.10.3 Avaliação da concentração de lipase

Para avaliar a eficiência da concentração de lipase na funcionalidade do EPC foram testadas duas concentrações desta enzima, 200 e 400 μL equivalente a 6,8 e 13,6 U de lipase, utilizando o palmitato de *p*-nitrofenila como substrato.

4.2.10.4 Avaliação de misturas de substratos

Os substratos óleo de soja e azeite foram misturados em diversas proporções, com o volume final de 2 mL, a 20 mL de tampão fosfato 0,05 mol/L (pH 8) na cela de reação e testados na funcionalidade do EPC.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE LIPASE POR *BOTRYOSPHERIA RIBIS* EC-01

Uma recente comparação da produção de lipase por *B. ribis* EC-01 em fermentação submersa cultivado separadamente nas tortas de soja, mamona e milho a 1 % (m/v), com ou sem adição de Meio Mínimo de Sais de Vogel (MMSV), foi descrita por Barbosa et al. (2011). Neste estudo, a torta de soja promoveu maior produção de lipase sem adição de outro complemento, somente água, seguida da torta de mamona.

Dando continuidade aos estudos de produção de lipase por este fungo, experimentos foram realizados separadamente. Primeiro com a torta de soja, buscando a melhor concentração e a essa concentração outros nutrientes foram adicionados, como fosfatos e aminoácidos. Em outra parte do experimento, a torta de mamona foi testada em combinações com a torta de soja e a adição de glicerol PA e residual também foi avaliada. Feita a seleção das variáveis que influenciaram positivamente a síntese desta enzima, planejamentos fatoriais foram desenvolvidos a fim de otimizar a produção.

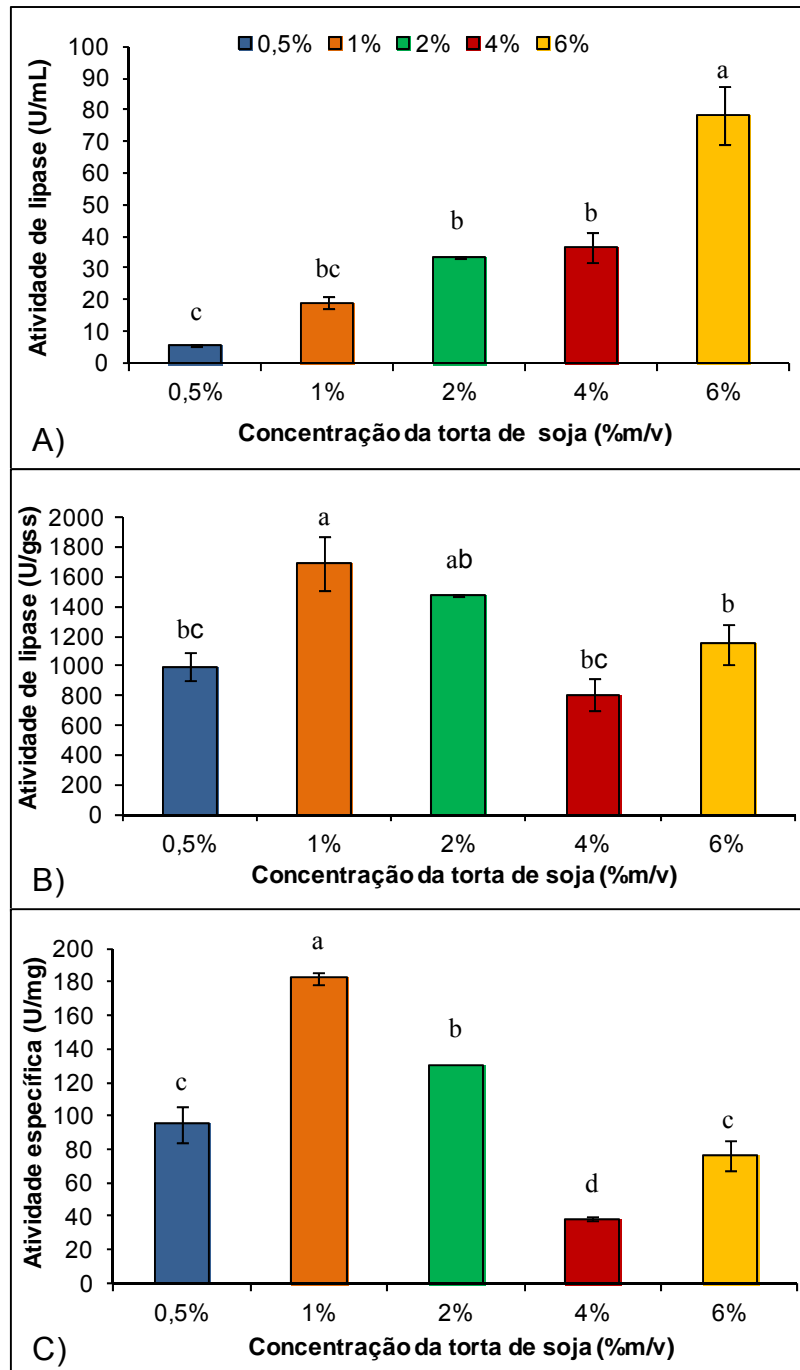
Os resultados estão expressos tanto em U/mL (atividade volumétrica), U/mg de proteína (atividade específica) e U/gss (U/g de substrato seco). Quando se utiliza resíduos agroindustriais como substratos para a produção de lipase por fermentação submersa, estas três unidades de atividade enzimática devem ser consideradas.

5.1.1 Efeito da Concentração da Torta de Soja

A torta de soja foi analisada separadamente nas concentrações de 0,5 a 6 % (m/v) como substrato para a produção de lipase por *B. ribis* EC-01. Os resultados encontram-se na Figura 16. A concentração de 1 % (m/v) promoveu maior produção de lipase tanto em atividade por grama de substrato seco ($1690 \pm 181,7$ U/gss), como em atividade específica ($182,5 \pm 2,64$ U/mg) mostradas nas Figuras 15 b e c. Considerando que a torta de soja é rica em proteína (Tabela 12), altos títulos de lipase ($79,4 \pm 6,56$ U/mL) foram obtidos na concentração de 6% (m/v) de torta de soja (Figura 15 a). Mas se comparados com a atividade específica a 6 %

(m/v), estes resultados não correspondem a altos índices de atividade de lipase ($76,3 \pm 6,58$ U/mg), menor do que a alcançada com 1% (m/v) da torta ($182,5 \pm 2,64$ U/mg).

Figura 16 – Produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 utilizando concentrações crescentes de torta de soja como substrato em a) U/mL; b) U/gss e c) U/mg¹



Fonte: próprio autor

¹letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0.05) entre as médias pelo teste de Tukey.

Tabela 12 – Composição centesimal (g/100 g) das tortas de resíduos agroindustriais

| Torta | Carboidratos | Lipídeos | Proteínas | Cinzas | Umidade |
|--------------|---------------------|-----------------|------------------|---------------|----------------|
| Mamona | 47,21 | 1,38 | 31,83 | 7,07 | 12,51 |
| Soja | 30,70 | 0,74 | 49,38 | 6,18 | 13,00 |

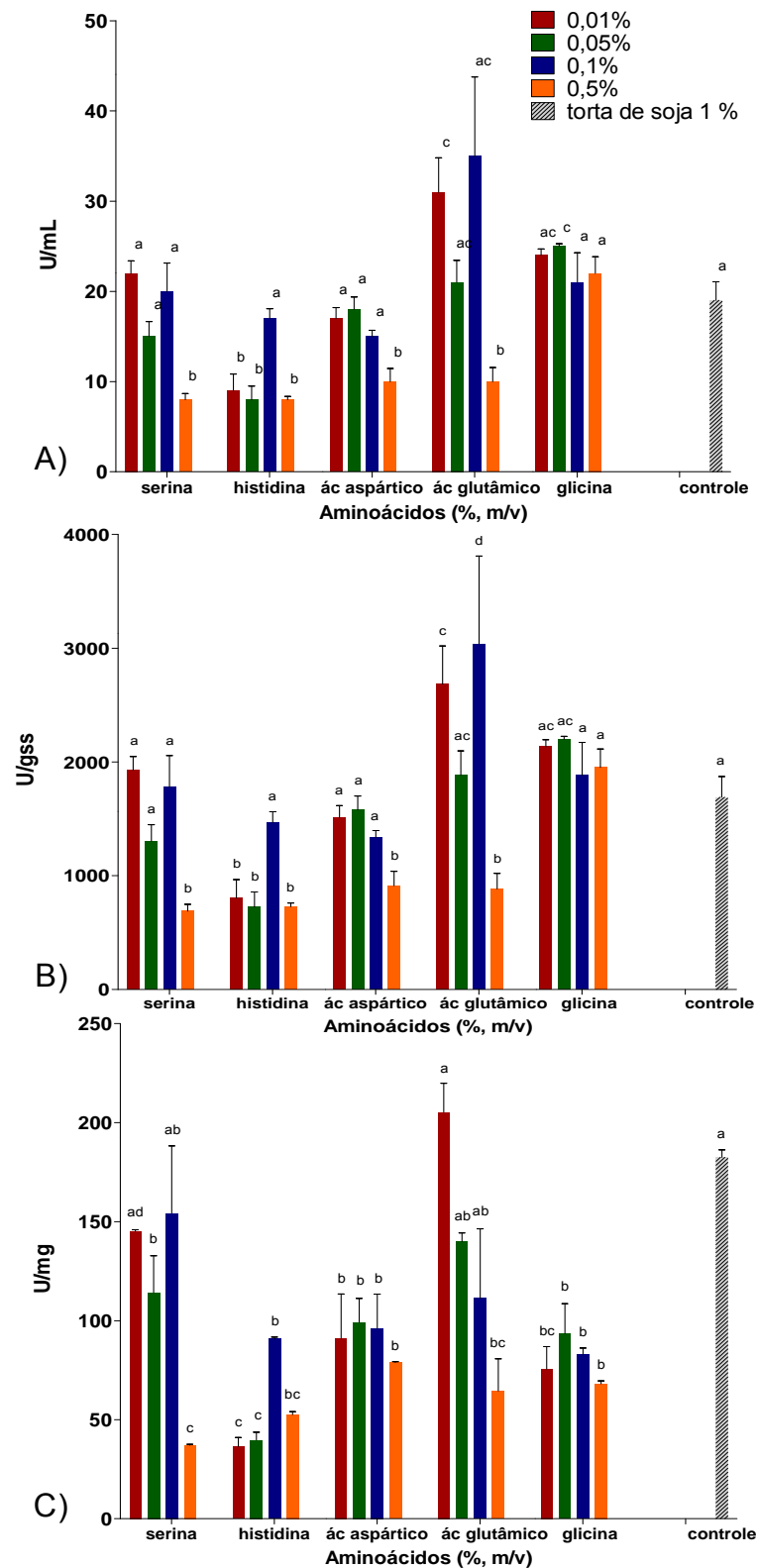
Fonte: COSTA (2008)

5.1.2 Efeito da Adição de Aminoácidos à Torta de Soja

Tortas vegetais são amplamente utilizadas na fermentação estado sólido (FES) por proporcionar fonte de carbono mas também a de nitrogênio. A torta de soja é rica em proteínas e aminoácidos, especialmente arginina, leucina e lisina (RAMACHANDRAN et al., 2007). Poucos estudos tem sido relatados utilizando esta torta por fermentação submersa para produção de lipases (LOTRAKUL; DHARMSTHITI, 1997; TAN et al., 2003; TAN et al., 2004). A maioria dos estudos têm utilizado meios ricos nutrientes com adição de óleos vegetais (soja, azeite), fontes de sulfato e fosfatos, peptona, glucose, extracto de levedura, milho, etc. Entretanto, a torta de soja é rica em alguns aminoácidos e não em todos aqueles presentes na tríade catalítica (serina, histidina, ácido glutâmico ou aspártico). A adição de cada um dos aminoácidos acima citados, no intervalo de concentrações de 0,01 a 0,5 % (m/v), usando apenas água destilada e torta de soja 1 % (m/v) foi avaliada para verificar o efeito na produção de lipase como um meio nutricional mais barato. A glicina também foi incluída no estudo uma vez que este aminoácido é parte da composição de lipase, embora não pertença à tríade catalítica.

A Figura 17 traz a comparação da produção de lipase por *B. ribis* EC-01 em torta de soja 1 % (m/v) com adição de diferentes aminoácidos em U/mL, U/gss e U/mg. Na Figura 17 a, comparando-se os aminoácidos avaliados na concentração de 0,01 % (m/v) foi verificado que o ácido glutâmico estimulou a produção de lipase em 60 % ($31 \pm 3,8$ U/mL), em relação ao controle ($19 \pm 2,0$ U/mL). Glicina (0,05%, m/v) aumentou a produção da enzima em 31 % ($25 \pm 0,3$ U/mL). Em ambas concentrações os demais aminoácidos não mostraram nenhuma diferença significativa quando comparado com o controle.

Figura 17 – Comparação da produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em torta de soja com adição de diferentes aminoácidos em (a) U/mL, (b) U/gss e (c) U/mg¹



Fonte: próprio autor

¹letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) comparada ao controle pelo teste de Tukey.

Kathiravan et al. (2012) testaram vários aminoácidos na produção de lipase pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* sob fermentação submersa (Fsub) e observaram que para o ácido glutâmico e a glicina numa concentração de 0,2 % em um meio mínimo (MM), sem a torta de soja, o aumento da produção de lipase foi de 240 e 200%, respectivamente. Makhzoum et al. (1995) testamos aminoácidos a 5 mM como única fonte de nitrogênio em um MM para a produção de lipase por *Pseudomonas fluorescens* 2D; o ácido glutâmico e a glicina foram os aminoácidos que mostraram um efeito moderado aumentando a produção.

Considerando em termos de U/gss (Figura 17 b), o ácido glutâmico nas concentrações de 0,01 e 0,1% foi o único aminoácido que mostrou uma diferença significativa no aumento ($p < 0,05$) da produção de lipase por *B. ribis* EC-01, em relação ao controle (1690 \pm 181 U/gss). O ácido glutâmico na concentração de 0,01% promoveu um aumento de 60% (2684 \pm 336 U/gss) na atividade da lipase enquanto que a 0,1%, o aumento foi de 80% (3.039 \pm 771 U/gss) comparado ao controle.

Em relação à atividade específica (Figura 17 c), nenhum dos aminoácidos testados em nenhuma concentração promoveu aumento significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle. Nahas (1988) estudando fatores que influenciavam a produção de lipase por *Rhizopus oligosporus* descobriu que os aminoácidos testados como fonte de nitrogênio não estimularam a produção da enzima em um meio contendo glucose.

5.1.3 Efeito das Fontes de Fosfato Adicionadas à Torta de Soja

As fontes de fosfato K_2HPO_4 e KH_2PO_4 têm sido utilizadas rotineiramente na produção de lipases por vários micro-organismos (FADILOGLU; ERKMEN, 1999; LIMA et al., 2003; SANGEETHA et al., 2010).

A Tabela 13 apresenta os resultados em U/mL, U/gss e U/mg para estas duas fontes testadas a 0,5% (m/v). Como pode ser observado, a fonte de fosfato diácido de potássio (KH_2PO_4) promoveu maior produção de lipase comparada a fonte de fosfato monoácida (K_2HPO_4) nas três unidades testadas. Entretanto, comparada ao controle, esta fonte (KH_2PO_4) não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), apesar de o aumento relativo ser de 10,4, 10,5 e 25,3 % nestas três unidades, respectivamente.

Tabela 13 – Influência das fontes de fosfato na produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01¹

| Fosfato | U/mL | U/gss | U/mg |
|--------------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| K ₂ HPO ₄ | 4,69 ± 0,19 ^b | 413,1 ± 17,2 ^b | 41,7 ± 6,05 ^b |
| KH ₂ PO ₄ | 21,2 ± 3,36 ^a | 1868 ± 296 ^a | 228 ± 46,2 ^a |
| Controle (torta de soja 1 %, m/v) | 19,2 ± 2,06 ^a | 1690 ± 181 ^a | 182 ± 3,74 ^a |

Fonte: próprio autor

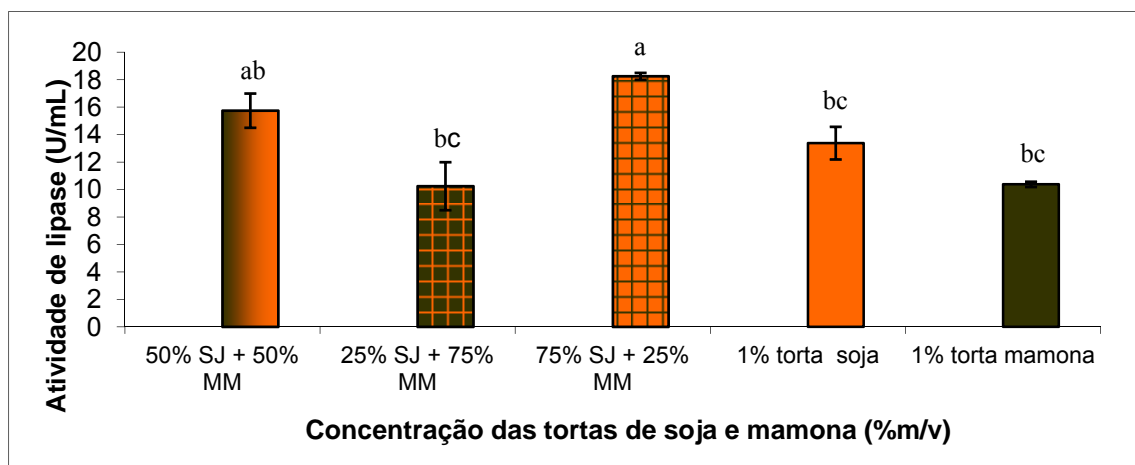
¹letras diferentes na coluna indicam diferença significativa(p <0,05) comparada ao controle pelo teste de Tukey.

5.1.4 Efeito da Torta de Soja Combinada à Torta de Mamona e Adição de Glicerol

Sabendo que a torta de soja influencia positivamente na produção de lipase por *B. ribis* EC-01 na concentração de 1 % (m/v), combinações dessas duas tortas a 1 % (m/v) nas seguintes proporções 1:1, 1:3 e 3:1 foram avaliadas e comparadas ao controle de cada torta a 1 % (m/v).

Na Figura 18 é possível verificar que quando as tortas foram utilizadas combinadas numa proporção de 1:1 (0,5 % (m/v) de cada torta), a atividade aumentou para 15,8 ± 1,2 U/mL (1398 ± 106,2 U/gss). Porém, quando comparado estatisticamente ao controle da torta de soja de 13,4 ± 0,6 U/mL (1179 ± 52,8 U/gss), esta mistura teve semelhança ao nível de p < 0,05.

Figura 18 – Influência das combinações das tortas de soja e mamona na produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01¹



Fonte: próprio autor

SJ: soja; MM: mamona

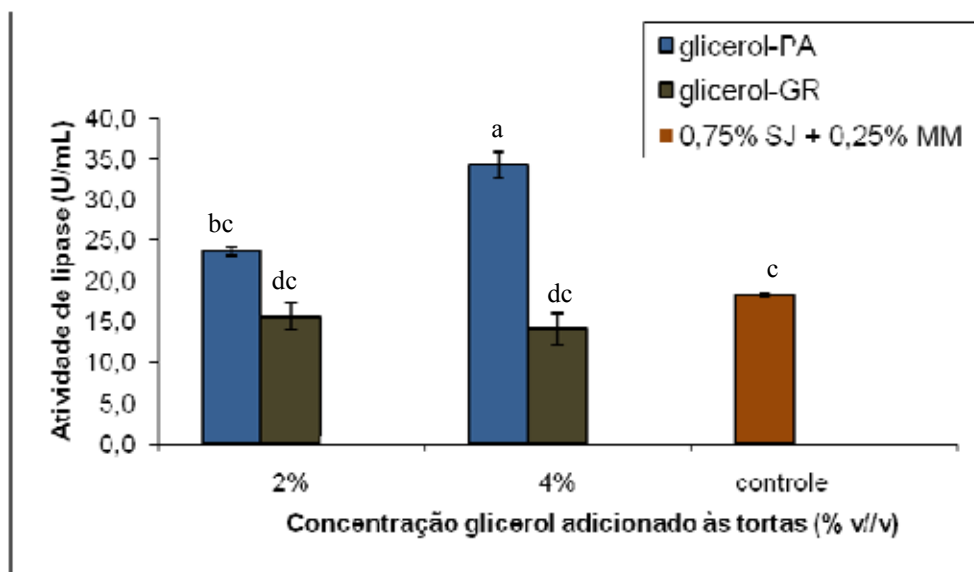
¹letras diferentes indicam diferença significativa(p <0,05) entre as médias pelo teste de Tukey.

A uma proporção de 1:3 (0,25% (m/v) torta de soja e 0,75% (m/v) torta de mamona), os títulos de lipase diminuíram para $10,3 \pm 1,7$ U/mL ($913,4 \pm 150,8$ U/gss), apresentando diferença não significativa ($p < 0,05$) com os dois controles de torta de soja e mamona a 1 % (m/v). Já a proporção, 3:1 (0,75% (m/v) torta de soja e 0,25% (m/v) torta de mamona), a produção de lipase aumentou para $18,3 \pm 0,2$ U/mL ($1614 \pm 17,6$ U/gss), sendo estatisticamente diferente em relação aos dois controles ($p < 0,05$).

Consequentemente, ambas as tortas foram selecionadas como variáveis que influenciaram na produção de lipases por *B. ribis* EC-01. Os resultados deste estudo apóiam ainda que altos títulos de lipase podem ser produzidos a partir de tortas de plantas oleaginosas, como soja e mamona, por fermentação submersa usando apenas água, sem suplementos adicionais, sendo que estas duas tortas contêm nutrientes necessários para suportarem o crescimento do fungo e então, produção de lipases, como mostra a Tabela 12.

A Figura 19 ilustra a influência do glicerol-PA e glicerol residual-GR (subproduto industrial da produção de biodiesel) sobre a produção de lipase. As concentrações de 2 e 4 % (v/v) foram adicionadas à combinação das tortas de soja e mamona que proporcionou maior produção de lipase (3:1).

Figura 19 – Influência da adição de glicerol-PA e GR à combinação das tortas de soja e mamona (3:1) na produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01¹



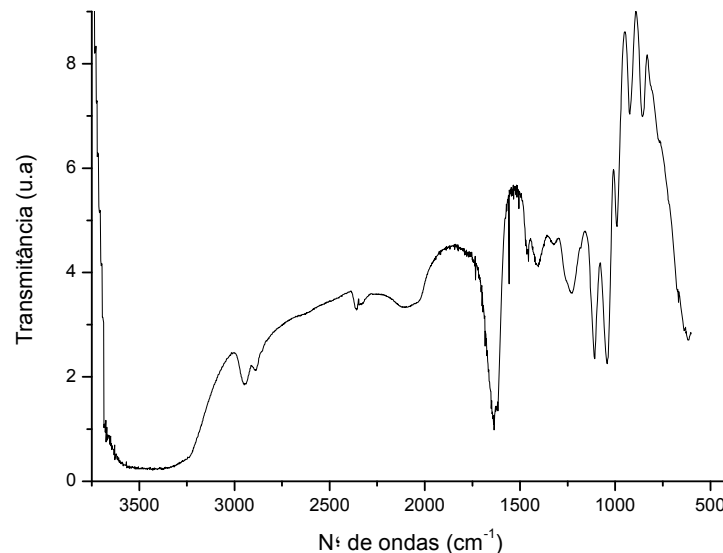
Fonte: próprio autor

SJ: soja; MM: mamona

¹letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias pelo teste de Tukey.

A adição de glicerol-PA 2 e 4 % (v/v) à essa combinação aumentou, respectivamente, a produção em 29 e 87%. Porém, somente a adição de 4 % (v/v) de glicerol-PA proporcionou um aumento de atividade significativo em relação ao controle ($p < 0,05$). Por outro lado, quando o glicerol-GR foi adicionado às tortas, em condições semelhantes, os títulos de lipase diminuíram em 14,8 e 69,4%, respectivamente, não apresentando diferença com o controle ($p < 0,05$). A análise de espectroscopia de infravermelho em disco de KBr do glicerol-GR mostrou evidência de impurezas que provavelmente foram responsáveis pela diminuição da produção de lipase, ou, a atividade de lipase foi inibida de alguma forma (Figura 20).

Figura 20 – Espectro de infravermelho do glicerol residual (GR) utilizado para a produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01



Fonte: próprio autor

A produção química comercial de biodiesel a partir do óleo de soja envolve um catalisador homogêneo alcalino (NaOH) e um álcool (metanol), e na reação, o metóxido de sódio é formado que esterifica os ácidos graxos livres liberados (AGL). O ácido sulfúrico é utilizado para neutralizar a reação, e o glicerol é um sub-produto, que pode estar contaminado com os reagentes e os produtos formados. A composição química final do glicerol-GR depende do tipo de catalisador utilizado na produção do biodiesel, da eficiência de transesterificação, impurezas presentes na matéria-prima oleaginosa, e, se o metanol e o catalisador foram totalmente recuperados (Yang et al., 2012). O metóxido de sódio foi encontrado no glicerol-GR (C-O aparece como um duplete

em aproximadamente 1070 e 1088 cm^{-1}) e também AGL (C= 0 em 1700 cm^{-1} e C-O em 1300 cm^{-1} , aproximadamente) como mostra a Figura 19.

Considerando que as tortas de soja e mamona, KH_2PO_4 , assim como o glicerol-PA afetaram positivamente a produção de lipase por *B. ribis* EC-01, estas foram as variáveis estudadas por planejamento fatorial utilizando a metodologia de superfície de respostas para otimizar a produção desta lipase.

5.1.5 Otimização da Produção de Lipase por *Botryosphaeria Ribis* EC-01 Utilizando Metodologia de Superfície de Resposta

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma técnica baseada em planejamentos fatoriais que foi introduzida por G. E. P. COX (1950) e desde então, tem sido utilizada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais. A MSR apresenta duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. A primeira etapa é realizada através do ajuste de modelos simples (lineares ou quadráticos) em razão das respostas obtidas com planejamentos fatoriais. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um modelo, ou seja, onde a resposta de interesse varia de forma mais pronunciada (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007).

Para o melhoramento e otimização da produção de lipases por micro-organismos, tanto o delineamento fatorial quanto a MSR têm sido utilizados. Variáveis como quantidade de inóculo, pH inicial do meio, fonte de nitrogênio, fonte de fosfato e aeração têm sido descritos por vários pesquisadores (GOBETTI et al., 1999; MURALIDHAR et al., 2001; LIU; LU; CHANG, 2006; HE; TAN, 2006, TENG; XU, 2008).

A influência das variáveis (itens 5.1.1 a 5.1.4) selecionadas foi estudada pelo desenvolvimento de dois planejamentos estatísticos, nomeados de Tratamento I e II.

Tratamento I. O principal objetivo do planejamento fatorial 2^4 foi avaliar o efeito das variáveis: concentrações de torta de soja (X_1), torta de mamona (X_2), glicerol PA (X_3) e KH_2PO_4 (X_4), na produção de lipase por *B. ribis* EC-01 principalmente em U/gss, visando maior produção de lipase com o mínimo de substrato possível.

A Tabela 14 apresenta os resultados do planejamento 2^4

desenvolvido. A produção de lipase variou de 360,9 a 3219 U/gss dependendo da composição do meio após 120 h de fermentação.

Tabela 14 – Planejamento fatorial para avaliação das variáveis torta de soja e mamona, glicerol PA e fosfato monobásico na produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 e as respostas obtidas (atividades enzimáticas).

| Nº do experimento | Variáveis codificadas | | | | Respostas | | |
|-------------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|-----------|------|-------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ | X ₄ | U/mL | U/mg | U/gss |
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 8,03 | 184 | 1413 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | -1 | 16,9 | 59,8 | 593,6 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | -1 | 20,9 | 98,7 | 1844 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | -1 | 42,4 | 117 | 1247 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | -1 | 18,3 | 103 | 3219 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | -1 | 67,3 | 284 | 2367 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | -1 | 30,1 | 105 | 2665 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | -1 | 92,6 | 365 | 2720 |
| 9 | -1 | -1 | -1 | 1 | 2,05 | 43,4 | 360,9 |
| 10 | 1 | -1 | -1 | 1 | 45,7 | 148 | 1607 |
| 11 | -1 | 1 | -1 | 1 | 8,33 | 52,1 | 737,2 |
| 12 | 1 | 1 | -1 | 1 | 59,7 | 212 | 1753 |
| 13 | -1 | -1 | 1 | 1 | 3,03 | 95,3 | 532,9 |
| 14 | 1 | -1 | 1 | 1 | 48,2 | 235 | 1696 |
| 15 | -1 | 1 | 1 | 1 | 7,00 | 35,8 | 619,2 |
| 16 | 1 | 1 | 1 | 1 | 23,4 | 89,0 | 688,5 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 28,8 | 136 | 1449 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 32,0 | 153 | 1609 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23,9 | 114 | 1204 |

| Variáveis | Níveis reais e codificados | | |
|--|----------------------------|------|-----|
| | -1 | 0 | +1 |
| X ₁ torta soja (% m/v) | 0,5 | 1,5 | 2,5 |
| X ₂ torta mamona (% m/v) | 0 | 0,25 | 0,5 |
| X ₃ glicerol - PA (% v/v) | 0 | 3 | 6 |
| X ₄ KH ₂ PO ₄ (% m/v) | 0,1 | 0,35 | 0,6 |

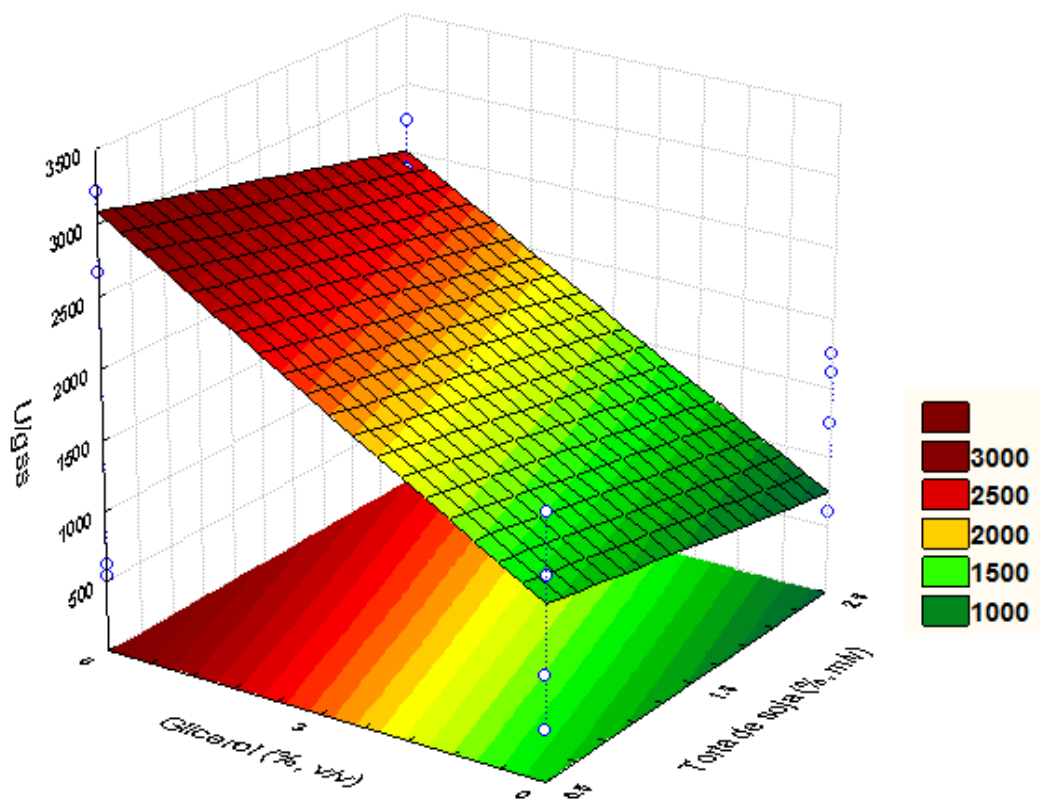
Fonte: próprio autor

A equação preditiva 9 ($R^2 = 0,93$) em função das variáveis independentes para a produção de lipase em U/gss indicou que a torta de mamona não teve efeito significativo. No modelo linear, os efeitos de interação entre a torta de soja e KH₂PO₄, glicerol e KH₂PO₄, assim como as variáveis KH₂PO₄ e glicerol foram significativos ($p \leq 0,05$) e estão em negrito na equação 15 abaixo.

$$U/g_{ds} = 1490,8 + 80,1 X_1 + 30,5 X_2 + 309,5 X_3 + 1504,6 X_4 - 12,2 [(X_1)(X_2)] - 25,6 [(X_1)(X_3)] + 956,7 [(X_1)(X_4)] - 170,6 (X_2 X_3) - 80,1 [(X_2)(X_4)] - 424,7 [(X_3)(X_4)]$$

O gráfico de superfície de resposta gerado a partir do ajuste do modelo (Figura 21) indica a influência da torta de soja e glicerol na produção de lipase (U/gss) e a resposta obtida do modelo linear preditivo foi maior que 3000 U/gss.

Figura 21– Superfície de resposta para a produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01– Tratamento I (atividade em U/gss)



Fonte: próprio autor

Tratamento II. Baseado nos resultados obtidos no Tratamento I, um planejamento fatorial 2^2 adicionado de pontos foi desenvolvido utilizando-se novos níveis de variação a fim de melhorar a curva da superfície de resposta em direção à máxima produção de lipase em termos de U/gss.

Os resultados experimentais estão apresentados na Tabela 15 (experimentos 1–11) e as análises de variância para a produção de lipase em U/mL, atividade específica (U/mg) e U/gss estão na Tabela 16.

As equações polinômicas quadráticas relacionando os fatores e as respostas nas três unidades citadas acima estão mostradas como equações **10**, **11** e **12**. A variável torta de soja foi significativa para a produção de lipase ($p \leq 0,05$). Os fatores significativos assim como os efeitos de interação estão em negrito nestas equações.

Tabela 15 – Planejamento fatorial para avaliar os efeitos da torta de soja e glicerol PA na produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 e as respostas obtidas (atividades de lipase).

| Experimento | Variáveis codificadas | | Respostas | | |
|-------------|-----------------------|----------------|-----------|-------|--------|
| | X ₅ | X ₆ | U/mL | U/mg | U/g ss |
| 1 | -1 | -1 | 40,9 | 89,2 | 3334 |
| 2 | -1 | 1 | 40,3 | 80,2 | 3287 |
| 3 | 1 | -1 | 76,7 | 63,5 | 2312 |
| 4 | 1 | 1 | 65,0 | 44,5 | 1960 |
| 5 | 0 | 0 | 77,1 | 81,4 | 3394 |
| 6 | 0 | 0 | 68,3 | 70,6 | 3004 |
| 7 | 0 | 0 | 67,0 | 80,7 | 2948 |
| 8 | -1,41 | 0 | 39,6 | 119,4 | 4977 |
| 9 | 1,41 | 0 | 52,3 | 51,2 | 1394 |
| 10 | 0 | -1,41 | 53,0 | 90,3 | 2332 |
| 11 | 0 | 1,41 | 70,1 | 60,0 | 3083 |

| Variáveis | Níveis reais e codificados | | | | |
|-------------------------------------|----------------------------|-----|-----|-----|-------|
| | -1,41 | -1 | 0 | +1 | +1,41 |
| X ₅ (torta soja, % m/v) | 0,7 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 3,3 |
| X ₆ (glicerol-PA, % v/v) | 1,0 | 2,0 | 4,5 | 7,0 | 8,0 |

Fonte: próprio autor

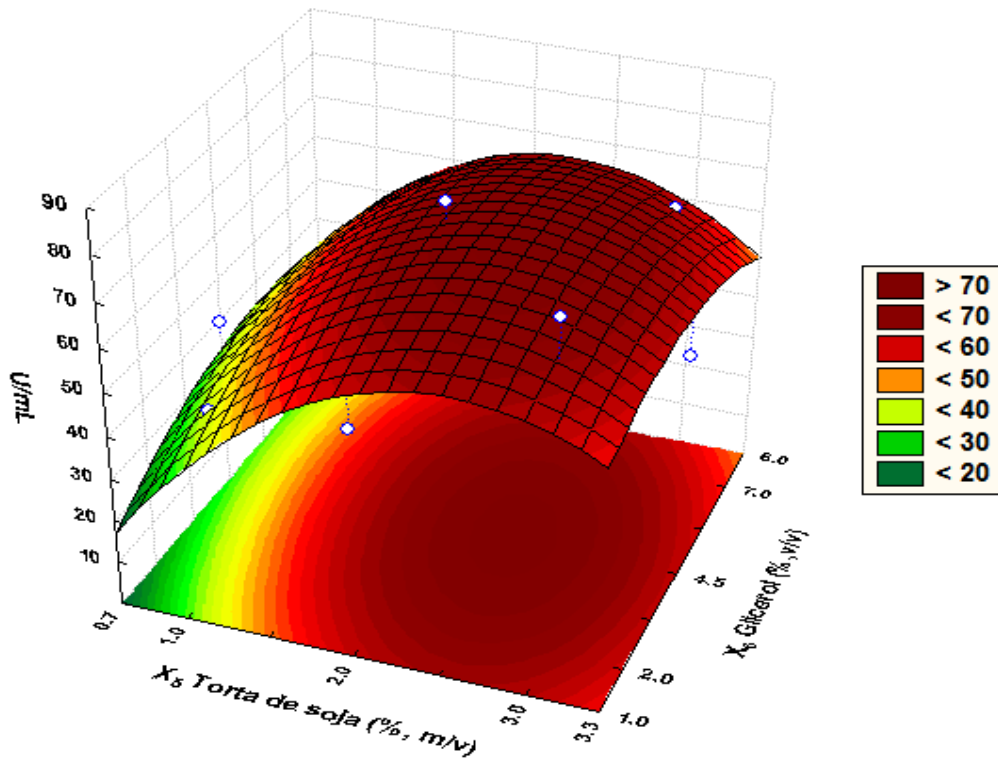
O modelo calculado para a produção de lipase em U/mL esta descrito abaixo.

$$U_{/mL} = 70,8 + 9,8 X_5 - 12,0 (X_5)^2 + 1,5 X_6 - 4,1 (X_6)^2 - 2,8 (X_5 X_6) \quad (10)$$

A superfície de resposta para a produção de lipase em U/mL esta apresentado na Figura 22.

De acordo com a curva tridimensional, a produção máxima de lipase por *B. ribis* EC-01 estimada pelo modelo foi 71,0 U/mL, quando as concentrações de torta de soja e glicerol PA foram de 2,4 % (m/v) e 4,5 % (v/v), respectivamente.

Figura 22 – Superfície de resposta para a produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 – Tratamento II (atividade em U/mL)



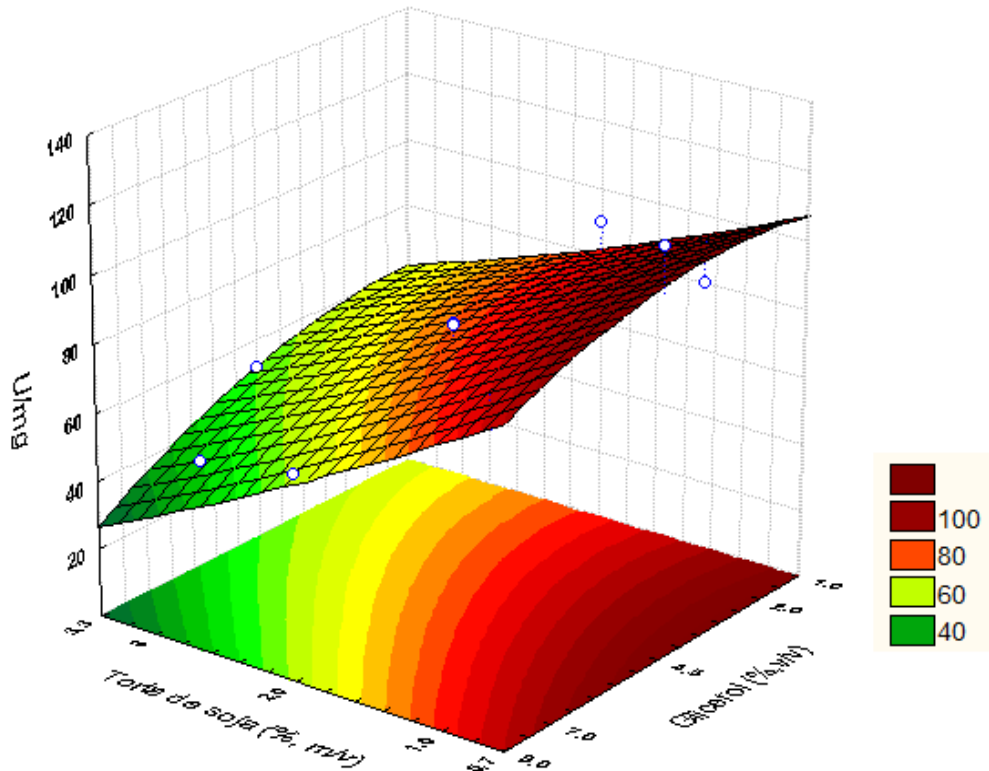
Fonte: próprio autor

O modelo calculado para a lipase em atividade específica (U/mg proteína) foi:

$$\frac{U}{mg} = 77,6 + 19,7 X_1 + 1,1 (X_1)^2 - 8,9 X_2 + 4,0 (X_2)^2 - 2,5 (X_1 X_2) \quad (11)$$

A superfície de resposta e o gráfico de contorno representando o modelo deduzido a partir dos dados experimentais estão mostrados na Figura 23. Foi possível determinar a região ótima de produção de lipase por *B. ribis* EC-01 e o valor estimado pelo modelo foi de 111,8 U/mg de proteína utilizando 0,6 % (m/v) de torta de soja e 2,8 % (v/v) de glicerol PA.

Figura 23 – Superfície de resposta para a produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 – Tratamento II (atividade em U/mg)



Fonte: próprio autor

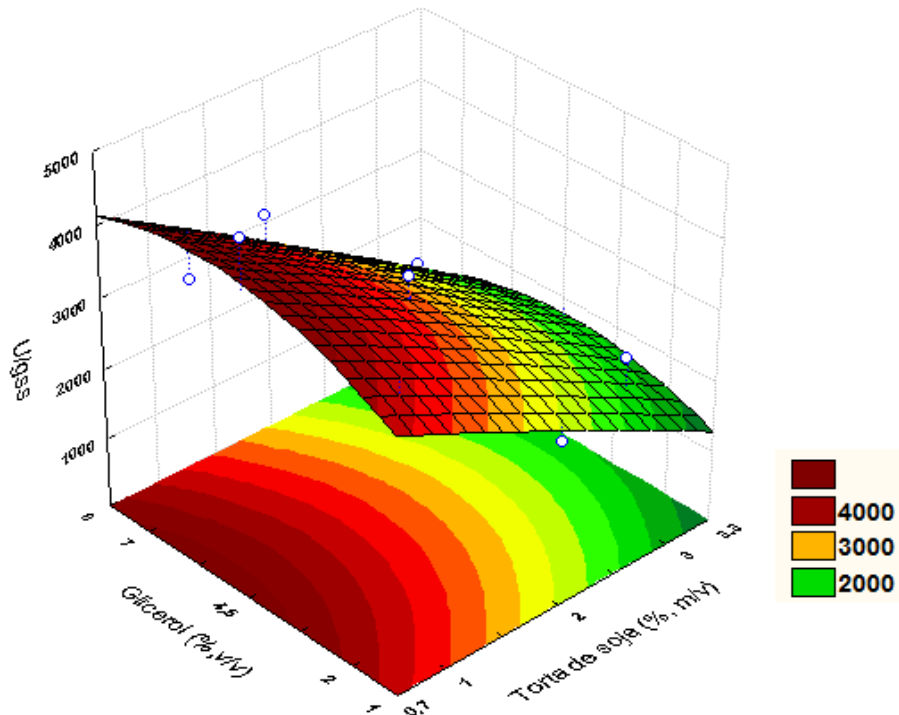
O modelo para a produção de lipase em U/gss esta descrito na equação:

$$\frac{U}{gss} = 3116,2 - 927,9 X_5 - 21,0 (X_5)^2 + 82,7 X_6 - 261,5 (X_6)^2 - 76,3 (X_5 X_6) \quad (12)$$

A Figura 24 apresenta o gráfico de superfície para a produção de lipase e o máximo título (4892 U/gss) foi obtido quando *B. ribis* EC-01 foi crescido em 0,5 % (m/v) de torta de soja e 5,2 % (v/v) de glicerol PA (valores estimados).

Os modelos quadráticos estão apresentados na Tabela 16 e mostram que $F_{calc} > F_{list}$ nos graus de liberdade correspondentes à produção de lipase em U/mL, U/mg proteína e U/gss. O valor F e os três valores de coeficiente de regressão (R^2) respectivos mostraram que os modelos ajustados tiveram boa capacidade preditiva e são estatisticamente válidos.

Figura 24 – Superfície de respostapara a produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 – Tratamento II (atividade em U/gss)



Fonte: próprio autor

Tabela 16 – Análise de variância (ANOVA) para o planejamento fatorial 2^2 para a produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 ($p \leq 0,05$).

| Respostas (atividade de lipase) | Fonte de variação | Soma Quadrados (SS) | Graus de Liberdade (DF) | Média Quadrados (MS) | F teste F_{calc} F_{list} | |
|---------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------------|-------------------|
| U/mL ^a | Modelo | 1623,5 | 2 | 811,8 | 14,1 | 4,46 ^b |
| | Residual | 461,5 | 8 | 57,7 | | |
| | Total | 2085,0 | 10 | | | |
| U/mg ^c | Modelo | 3879,4 | 1 | 3879,4 | 71,0 | 5,12 ^d |
| | Residual | 491,6 | 9 | 54,6 | | |
| | Total | 4371,0 | 10 | | | |
| U/gss ^e | Modelo | 7346781 | 1 | 7346781 | 46,7 | 5,12 ^f |
| | Residual | 1414502 | 9 | 157166,9 | | |
| | Total | 8761283 | 10 | | | |

Fonte: próprio autor

^a $R^2 = 0,779$; ^b $F_{95\%.2,8}$; ^c $R^2 = 0,888$; ^d $F_{95\%.1,9}$; ^e $R^2 = 0,839$; ^f $F_{95\%.1,9}$

A torta de soja foi utilizada por Liu e Zhang (2011) como substrato para a produção de lipase por uma cepa da levedura *Candida antarctica* (DSM-3855) utilizando MSR e a produção ótima desta enzima (27,34 U/mL) foi obtida em pH 6, 26 °C e 3,38 % (m/v) de torta de soja em um meio complexo contendo extrato de levedura, óleo de soja e Tween-80 após 58 h de crescimento em um fermentador de 15 L.

Considerando que todos os experimentos com *B. ribis* EC-01 foram conduzidos em escala de bancada, existe um grande potencial de incrementar a produção de lipase por este fungo aumentando a escala em um fermentador.

Validação do modelo. A validação experimental do modelo foi executada nas três condições estabelecidas em U/mL, U/mg de proteína e U/gss, onde a torta de soja e o glicerol PA estavam em concentrações de 2,4 % (m/v), 4,5 % (v/v); 0,6 % (m/v), 2,8 % (v/v); e 0,5 % (m/v), 5,2 % (v/v); respectivamente, utilizando somente água destilada.

A Tabela 17 apresenta os resultados experimentais obtidos e os preditivos (intervalo de confiança de 95 %) pelo modelo nas três condições experimentais de produção de lipase por *B. ribis* EC-01.

Tabela 17 – Comparação dos resultados experimentais com os preditivos calculados pelo modelo matemático na produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01.

| Atividade | Observado^a | Predito |
|------------------|------------------------------|----------------|
| U/mL | 76,6 ± 7,97 | 71,0 |
| U/mg | 138,7 ± 0,34 | 111,8 |
| U/gss | 4820 ± 248,8 | 4892 |

Fonte: próprio autor

^a os experimentos foram conduzidos em triplicata em 5 dias a 28°C e 180 rpm.

Os resultados obtidos experimentalmente para a produção de lipase por *B. ribis* EC-01 utilizando as três condições definidas acima estão de acordo com os valores preditos calculados pelo modelo. A validação para aumentar a produção de lipase em U/gss corroborou para uma extrapolação da faixa de substrato a um mínimo de 0,5 % (m/v) de torta de soja.

O custo de produção desta lipase também foi comparado quando *B. ribis* EC-01 foi cultivado por fermentação submersa (FSub) em: (i) 1 % (v/v) óleo de soja suplementado com MMSV, (ii) 1 % (m/v) torta de soja somente com água destilada e (iii) em duas condições otimizadas estatisticamente descritas acima (Tabela 18). Em consideração às estimativas de custos de produção da enzima, somente foram considerados os gastos com nutrientes, sem incluir os custos energéticos.

O custo unitário para produzir a lipase por *B. ribis* EC-01 sob condição de FSub foi mais baixo com a torta de soja (\$US 0,14 equivalente a R\$ 0,28) como substrato do que com o óleo de soja (\$US 0,95 equivalente a R\$ 1,88).O

alto custo da lipase produzida com óleo de soja foi devido ao custo deste óleo e ao suplemento adicionado (MMSV). A adição de glicerol à torta de soja aumentou os custos ((\$US 0,42 – 0,44 ou R\$ 0,83 – 0,87), mas a sua adição foi compensada pelo aumento da produção de lipase (1,44 e 4,03 vezes aumentada em U/mL; e 2,88 e 1,68 vezes aumentada quando a medida foi em U/gss) comparado a torta de soja sozinha, sob as condições otimizadas apresentadas acima (Tabela 17).

Tabela 18 – Comparação da produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 por fermentação submersa e o custo unitário (\$US) para produzir lipase de quatro meios nutrientes diferentes.

| Composição do meio | Título de lipase | | Custo da lipase ^a (\$US) | Referência |
|---|-------------------|-------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| | (U/mL) | (U/gss) | | |
| Óleo de soja (1% v/v em MMSV ^b) | 34,7 | - | 0,95 | Messias et al. (2009) ^c |
| Torta de soja (1% m/v em água destilada) | 13,4 | 1709 | 0,14 | este trabalho |
| Torta de soja (0,5 % m/v) + Glicerol-PA (5,2 % v/v) em água destilada | 27,4 | 4820 ^d | 0,44 | este trabalho |
| Torta de soja (2,4 % m/v) + Glicerol-PA (4,5 % v/v) em água destilada | 76,6 ^e | 2809 | 0,42 | este trabalho |

Fonte: próprio autor

^a baseado nos custos com nutrientes por litro de meio e água destilada, excluindo custos energéticos; ^b MMSV (meio mínimo de saís de Vogel); ^c tirado da Tabela 2; ^d lipase em U/gss como otimizado pelo modelo estatístico (*Tratamento II*); ^e lipase em U/mL como otimizado pelo modelo estatístico (*Tratamento II*).

5.2 PARÂMETROS CINÉTICOS E FÍSICO-QUÍMICOS DA LIPASE LIVRE DE *BOTRYOSPHERIA RIBIS* (EC-01)

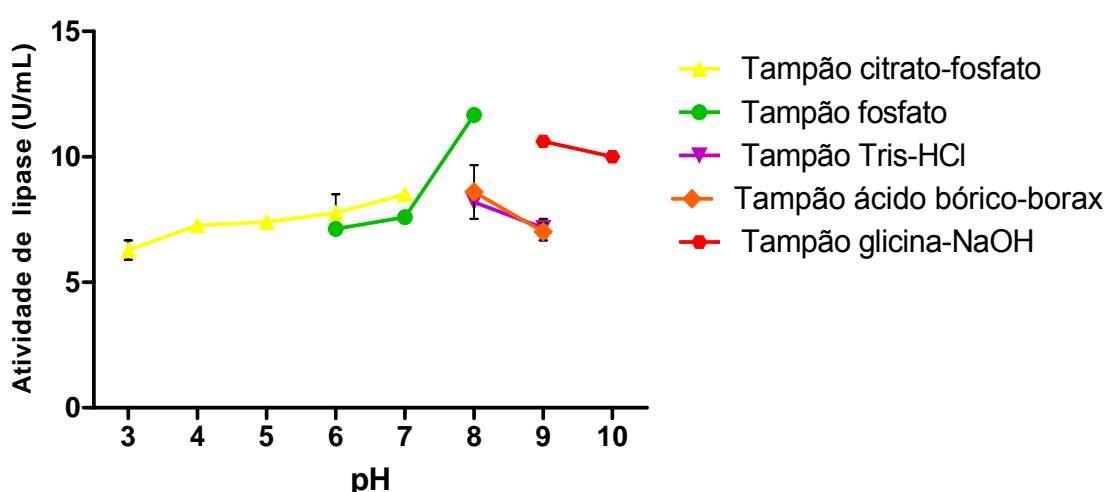
As lipases têm aplicação promissora em vários setores da indústria como de detergentes, oleoquímica, indústria de laticínios, indústria de agroquímicos, papel, alimentícia, indústria de cosméticos e farmacêutica (SHARMA et al., 2001). Cada aplicação requer propriedades únicas em relação à especificidade, estabilidade, temperatura, pH, entre outros.

A seguir serão apresentadas algumas propriedades que foram determinadas para a lipase livre de *Botryosphaeria ribis* EC-01 com o objetivo de caracterização desta enzima para possíveis aplicações e também sua imobilização.

5.2.1 Efeito do pH e Temperatura na Atividade e Estabilidade

A lipase de *B. ribis* EC-01 foi ativa em todos os valores de pH testados (Figura 25) e alcançou o máximo de atividade em tampão fosfato pH 8 que está de acordo com outras lipases fúngicas também em tampão fosfato (LIMA et al., 2004) e em Tris-HCl (SHU et al., 2006).

Figura 25 – Efeito do pH na atividade da lipase livre de *Botryosphaeria ribis* EC-01. A atividade foi determinada em pH 8 na condição padrão descrita no item 4.2.4



Fonte: próprio autor

Geralmente o pH ótimo para lipases fúngicas varia entre 6 e 9 (LIU et al., 2009b; DHEEMAN et al., 2011), mas o pH entre espécies pode variar bastante; o pH ótimo da lipase do gênero *Aspergillus* pode ser ácido, em torno de pH 2 (MHETRAS et al., 2009), neutro (HOSSEINPOUR et al., 2011) e alcalino a pH 9,0 (SAXENA et al., 2003). A lipase de *Penicillium* pode ter diferentes valores de pH ótimos variando de pH 5 (FREIRE et al., 1997; BANCERZ et al., 2005) a 10 (WU et al., 2003). A lipase de *Rizhopus* apresentou atividade ótima em pH 6 (POGORI et al., 2008), pH 7,5 (MATEOS DIAZ et al., 2006) e 8,5 (ESSANRI et al., 1998).

A Tabela 19 apresenta a estabilidade da lipase livre de *B. ribis* EC-01 em diferentes sistemas de tampões. Esta lipase exibiu boa estabilidade em pH de 3 – 10 após uma hora de incubação, a 30°C mantendo no mínimo 61% de sua atividade inicial. As lipases de *Pseudomonas fluorescens* AK102 (KOJIMA et al., 1994) e *Rhizopus chinensis* (POGORI et al., 2008) tiveram boa estabilidade em pH variando de 4 a 10. Dharmisthiti e Ammaranond (1997) relataram estabilidade para a

lipase de *Trichosporon asteroides* em pH na faixa de 3 – 10. Já Lima et al. (2004) avaliando a lipase de *Penicillium aurantiogriseum* relataram estabilidade nos valores de pH de 5 – 9 após 1h de incubação a 28°C.

Tabela 19 – Estabilidade da lipase livre de *Botryosphaeria ribis* EC-01 incubada em diferentes tampões e água destilada durante 1 h a 30 °C.

| Tampões ^a | pH | Atividade residual relativa (%) ^b |
|----------------------|----|--|
| Água destilada | - | 100 ± 1,35 |
| citrato-fosfato | 3 | 72,4 ± 2,69 |
| citrato-fosfato | 4 | 66,7 ± 1,35 |
| citrato-fosfato | 5 | 75,2 ± 0,67 |
| citrato-fosfato | 6 | 63,2 ± 3,20 |
| citrato-fosfato | 7 | 61,4 ± 3,70 |
| fosfato de sódio | 6 | 88,0 ± 0,84 |
| fosfato de sódio | 7 | 65,7 ± 0,67 |
| fosfato de sódio | 8 | 79,2 ± 2,19 |
| ácido bórico-boráx | 8 | 62,6 ± 4,38 |
| ácido bórico-boráx | 9 | 78,4 ± 1,83 |
| tris-HCl | 8 | 93,0 ± 1,85 |
| tris-HCl | 9 | 73,0 ± 2,53 |
| glicina-NaOH | 9 | 76,8 ± 3,20 |
| glicina-NaOH | 10 | 88,8 ± 5,39 |

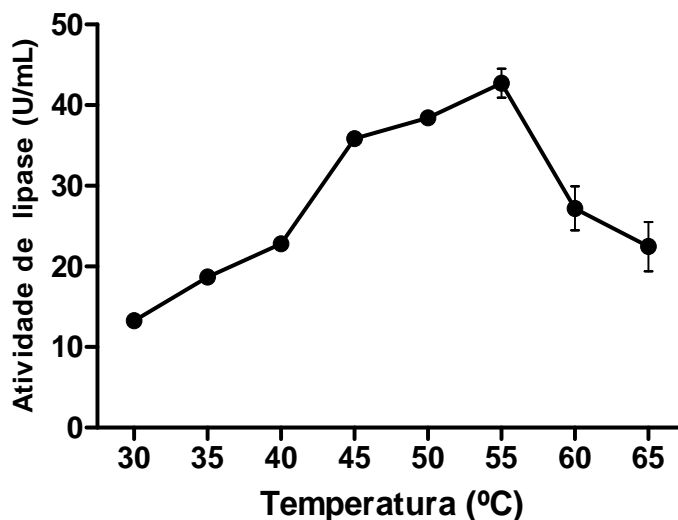
Fonte: próprio autor

^a 0,05M

^b 1h a 30°C. pNPP usado para determinar a atividade de lipase de acordo com item 4.2.4

As lipases fúngicas apresentam temperatura ótima normalmente de 25–30°C (SHARMA et al., 2011) exceto para fungos termofílicos que apresentam temperatura ótima entre 45 e 70°C (SHARMA et al., 2011; ZHENG et al., 2011). A lipase livre de *B. ribis* EC-01 demonstrou atividade ótima em temperatura de 55°C (Figura 26) que está de acordo com os resultados obtidos por algumas lipases de bactérias (CHARTRAIN et al., 1993; SULONG et al., 2006; BORKAR et al., 2009) e fúngicas (SAAD et al., 2005), e é similar àqueles obtidos pelos fungos *Myceliophthora* sp (ZANPHORLIN et al., 2010) e *Aspergillus niger* NCIM 1207 (MHETRAS et al., 2009) que apresentaram temperatura ótima a 50 °C.

Figura 26 – Efeito da temperatura na atividade da lipase livre de *Botryosphaeria ribis* EC-01. A atividade foi determinada na condição padrão descrita no item 4.2.4 variando-se as temperaturas.

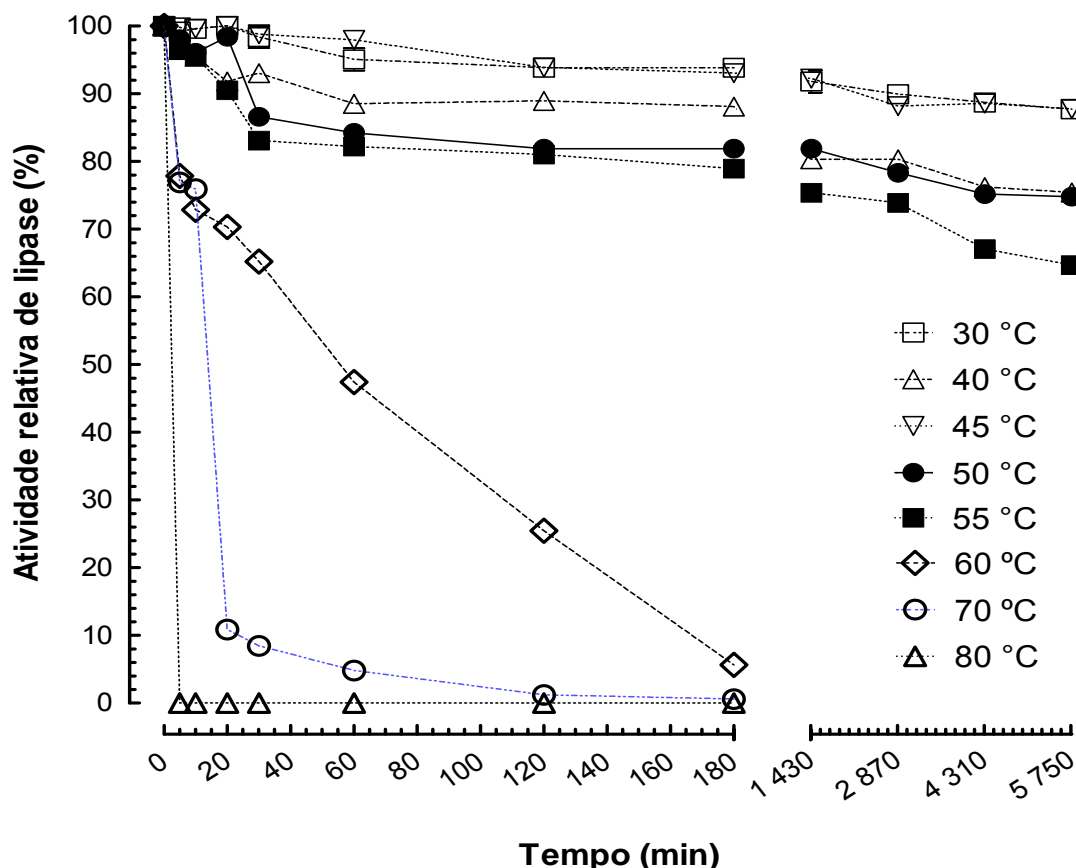


Fonte: próprio autor

A temperatura ótima descrita para a lipase do gênero *Aspergillus* foi 37 °C para *A. carneus* (SAXENA et al., 2003) e 50°C para o *A. niger* (MHETRAS et al., 2009). Para a lipase de *Rhizopus homothallicus*, a temperatura ótima foi 30°C (MATEOS DIAZ et al., 2006). A lipase *Trichosporon asteroides* exibiu atividade ótima a 50 °C (DHARMISTHITI; AMMARANOND, 1997). Dheeman et al. (2011) reportaram temperatura ótima de 45 °C para a lipase de *Penicillium* sp. DS-39 (DSM 23773).

A estabilidade térmica (no mínimo de 65%) foi observada na lipase livre de *B. ribis* EC-01 em temperaturas de 30 a 55 °C depois de 96 h de incubação (Figura 27). Em 48 horas, a atividade permaneceu de 74–90% nesta faixa de temperatura. A 60 °C a lipase de *B. ribis* EC-01 reteve 65 % de sua atividade inicial após 30 minutos e cerca de 50 % após 1 h de incubação. Durante 10 minutos a lipase livre foi estável a 70 °C.

Figura 27 – Estabilidade da lipase livre de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em diferentes temperaturas. O efeito da temperatura na estabilidade da lipase foi estudado medindo-se a atividade residual após o tempo de incubação em temperaturas variando de 30 a 80 °C. A atividade está expressa como porcentagem da atividade determinada a 55 °C na condição padrão (item 4.2.4).



Fonte: próprio autor

Resultados semelhantes a estes foram reportados para a lipase de *Talaromyces thermophilus* que manteve 60 % de sua atividade inicial após uma hora de incubação a 60 °C (ROMDHANE et al., 2010) e para a lipase de *Aspergillus carneus* que foi estável durante 5 min a 70 °C (SAXENA et al., 2003).

5.2.2 Efeito de Surfactantes íons Metálicos na Estabilidade

Na Tabela 20 pode-se notar que os surfactantes testados na concentração de 0,01 % (m/v) não ocasionaram efeito negativo na atividade da lipase de *B. ribis* EC-01, mas sim ativação da enzima. Tween 80 e SDS aumentaram aproximadamente 23 % sua atividade ($34,7 \pm 1,41$; $34,9 \pm 0,89$ U/mL, respectivamente) quando comparados ao controle ($28,3 \pm 0,38$ U/mL) após

incubação de 1 h a 30 °C. Já o Triton X-100 não afetou a atividade desta lipase ($28,9 \pm 0,75$ U/mL). Os mesmos resultados com Triton X-100 e Tween 80, na concentração de 1 % (m/v) foram encontrados por Liu et al.(2009b) para a lipase de *Fusarium solani* N4-2. Em contraste, Triton X-100, Tween-80 e SDS reduziram consideravelmente a atividade lipase de *Galactomyces geotrichum* Y05 para 33, 5 e 5%, respectivamente, quando utilizada a 1 % (m/v) (Yan et al., 2007).

Tabela 20 – Estabilidade da lipase livre de *Botryosphaeria ribis* EC-01 incubada em diferentes surfactantes. A atividade residual foi determinada na condição padrão descrita no item 4.2.4.

| Surfactantes ^a | Atividade relativa de lipase (%) ^b |
|---------------------------|---|
| Controle | 100 ± 0,17 |
| Tween 80 | 123 ± 5,00 |
| SDS | 124 ± 3,17 |
| Triton X-100 | 102 ± 2,67 |

Fonte: próprio autor

^a 0,01% (m/v)

^b 1h a 30°C. pNPP usado para determinar a atividade de lipase (condição padrão- item 4.2.4).

Os surfactantes em altas concentrações são conhecidos por desnaturar enzimas, principalmente os aniônicos como o SDS. Eles podem influenciar a atividade enzimática tanto pela ligação à enzima, alterando assim sua conformação, como também pela alteração do meio em que a enzima atua (RUBINGH, 1996). No caso dos ensaios com a lipase de *B. ribis* EC-01 uma baixa concentração do surfactante SDS foi utilizada (0,01 %, m/v), a qual não afetou a sua atividade de forma negativa.

Os efeitos de alguns sais metálicos na atividade da lipase de *B. ribis* EC-01 estão listados na Tabela 21 após 1 h de incubação a 30 °C. Os íons Mn^{2+} , Mg^{2+} e Ba^{2+} foram os ativadores mais significativos ($p < 0,05$), com uma diferença em relação ao controle variando de 14,1 a 33,5%, aumentando a atividade da lipase em quase todas as concentrações testadas.

A atividade das lipases de *Rhizopus homothallicus* (MATEOS DIAZ et al., 2006) e de uma cepa de *Penicillium* sp. DS-39 (DHEEMAN et al., 2011) também aumentaram em presença de Mn^{2+} , enquanto que diminuiu a atividade da lipase de *Rhizopus delemar* (AÇIKEL et al., 2011). O íon Mg^{2+} aumentou a atividade das lipases de *Aspergillus carneus* (SAXENA et al., 2003) e *Mucor hiemalis f. hiemalis* (HIOL et al., 1999). O Ba^{2+} não teve efeito significativo na lipase de

Galactomyces geotrichum Y05 (YAN et al., 2007), enquanto inibiu a lipase de *Fusarium solani* N4-2 (LIU et al., 2009b).

O Ca^{2+} não afetou a lipase de *B. ribis* EC-01 nas concentrações de 1–50, mas na concentração de 100 mM diminuiu 16,9 % ($p < 0,05$) a atividade desta lipase. Dheeman et al. (2011) reportaram que o Ca^{2+} a 1 e 10 mM aumentou a atividade da lipase de *Penicillium* sp. DS-39.

O íon Na^+ aumentou significativamente a atividade da lipase de *B. ribis* EC-01 ($p < 0,05$) a 1 mM, apresentando uma diferença significativa em relação ao controle de 13,9 %. Na^+ exerceu pouca influência na lipase de *Fusarium solani* N4-2 (LIU et al., 2009b) e aumentou a atividade da lipase de *Rhizopus delemar* (AÇIKEL et al., 2011).

Outros íons que não afetaram significativamente ($p < 0,05$) a atividade da lipase de *B. ribis* EC-01 foram K^+ , Zn^{2+} e Ag^+ . Os íons K^+ e Na^+ tiveram pouca influência na atividade da lipase de *Galactomyces geotrichum* Y05, mas o Zn^{2+} inibiu parcialmente e a Ag^+ , totalmente, na concentração de 1 mM (YAN et al., 2007).

A lipase de *B. ribis* EC-01 foi parcialmente inibida ($p < 0,05$) por Co^{2+} somente nas concentrações acima de 50 mM (com diferença significativa em relação ao controle de 37,6 a 47,7 %). Cu^{2+} , Hg^{2+} e Fe^{3+} já inibiu a lipase de *B. ribis* EC-01 em concentrações acima de 5 mM (inibição de 13,7 a 66,5 %). Os mesmos íons inibiram a atividade da lipase de *Rhizopus oryzae* a 5 mM (HIOL et al., 2000). O Hg^{2+} inibiu as lipases de *Penicillium* sp. DS-39, parcialmente (DHEEMAN et al., 2011) e *Galactomyces geotrichum* Y05, totalmente (YAN et al., 2007) a 1 mM. Abbas et al. (2002) reportaram que Co^{2+} a 1 mM aumentou a atividade da lipase de *Mucor* sp e Fe^{3+} inibiu totalmente na mesma concentração.

Os efeitos dos íons metálicos na atividade da lipase de *B. ribis* EC-01 podem ser explicados devido à hipótese de que alguns íons metálicos se ligam à enzima alterando a sua atividade pela estabilização ou desestabilização de sua conformação (DONG et al., 1999), através de interação com os grupos carregados da cadeia lateral dos amino ácidos (RAHMAN et al., 2006).

Tabela 21 – Influência de cátions metálicos na atividade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01. A atividade residual determinada na condição padrão comparada ao controle¹

| Íons metálicos | Atividade relativa de lipase (%) ² | | | | | |
|---------------------------------------|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | 1 mM | 5 mM | 10 mM | 25 mM | 50 mM | 100 mM |
| Controle | 100 ± 3,02 ^a | | | | | |
| Mn ²⁺ (MnCl ₂) | 123 ± 3,02 ^{bA} | 124 ± 0,60 ^{bA} | 120 ± 3,93 ^{bA} | 117 ± 4,23 ^{bA} | 101 ± 1,81 ^{aB} | 99,6 ± 0,60 ^{aB} |
| Mg ²⁺ (MgCl ₂) | 117 ± 3,93 ^{bA} | 114 ± 0,91 ^{bA} | 111 ± 5,44 ^{aA} | 116 ± 3,63 ^{bA} | 107 ± 0,91 ^{aA} | 104,7 ± 1,81 ^{aA} |
| Ca ²⁺ (CaCl ₂) | 107 ± 3,32 ^{aA} | 112 ± 4,23 ^{aA} | 101 ± 3,32 ^{aA} | 103 ± 4,23 ^{aA} | 94,9 ± 0,60 ^{aAB} | 83,1 ± 6,35 ^{bB} |
| K ⁺ (KCl) | 99,8 ± 1,51 ^{aAB} | 106 ± 3,32 ^{aA} | 107 ± 3,93 ^{aA} | 105 ± 3,93 ^{aAB} | 106 ± 4,83 ^{aAB} | 92,5 ± 0,91 ^{aB} |
| Zn ²⁺ (ZnCl ₂) | 99,4 ± 0,91 ^{aA} | 102 ± 3,32 ^{aA} | 98,3 ± 4,23 ^{aA} | 93,6 ± 1,21 ^{aA} | 96,4 ± 5,14 ^{aA} | 92,5 ± 2,72 ^{aA} |
| Na ⁺ (NaCl) | 114 ± 1,51 ^{bA} | 104 ± 4,53 ^{aAB} | 102 ± 3,63 ^{aAB} | 104 ± 3,93 ^{aAB} | 98,1 ± 4,53 ^{aB} | 98,1 ± 3,93 ^{aB} |
| Ba ²⁺ (BaCl ₂) | 95,5 ± 4,53 ^{aB} | 124 ± 2,12 ^{bA} | 133 ± 2,12 ^{bA} | 114 ± 1,21 ^{bAC} | 110 ± 4,83 ^{aC} | 97,6 ± 0,30 ^{aB} |
| Ag ⁺ (AgNO ₃) | 97,6 ± 1,51 ^{aA} | 97,4 ± 4,83 ^{aA} | 96,6 ± 3,93 ^{aA} | 101 ± 4,23 ^{aA} | 95,3 ± 3,02 ^{aA} | 98,1 ± 0,91 ^{aA} |
| Co ²⁺ (CoCl ₂) | 98,3 ± 3,02 ^{aAC} | 98,5 ± 3,32 ^{aAC} | 105 ± 3,93 ^{aA} | 91,5 ± 2,42 ^{aC} | 62,4 ± 0,60 ^{bB} | 52,4 ± 2,72 ^{bB} |
| Cu ²⁺ (CuSO ₄) | 95,5 ± 2,72 ^{aA} | 81,6 ± 3,63 ^{bB} | 75,4 ± 0,91 ^{bB} | 40,2 ± 4,83 ^{bC} | 36,8 ± 3,32 ^{bC} | 33,5 ± 0,30 ^{bC} |
| Hg ²⁺ (HgCl ₂) | 93,2 ± 3,63 ^{aA} | 86,3 ± 0,00 ^{bAB} | 72,9 ± 4,53 ^{bBC} | 69,4 ± 3,93 ^{bC} | 65,2 ± 3,93 ^{bC} | 65,2 ± 5,74 ^{bC} |
| Fe ³⁺ (FeCl ₃) | 96,4 ± 3,32 ^{aA} | 72,6 ± 3,63 ^{bB} | 71,6 ± 5,14 ^{bB} | 81,4 ± 0,30 ^{bAB} | 79,1 ± 3,63 ^{bB} | 57,7 ± 5,44 ^{bBC} |

Fonte: próprio autor

¹Valores com letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$) comparada ao controle pelo teste de Tukey. Valores com letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as concentrações do mesmo íon pelo teste de Tukey.

² 1h a 30°C. pNPP usado para determinar a atividade de lipase (condição padrão-item 4.2.4).

5.2.3 Efeito de Solventes Orgânicos na Estabilidade

A atividade da lipase de *B. ribis* EC-01 foi avaliada na presença de solventes miscíveis em água como acetona, butanol, isopropanol, metanol e etanol em concentrações variando de 1 a 99,3% (v/v), quando incubada por 1h a 30°C (Tabela 22). A atividade residual relativa da lipase variou de 18,7 a 68% (v/v).

Tabela 22 – Influência de diferentes solventes na atividade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01. A atividade residual foi determinada na condição padrão

| Solventes (% v/v) | Atividade residual relativa (%) ^a |
|-----------------------------|--|
| Controle | 100 ± 5,26 |
| Acetona (99,3) | 31,1 ± 1,23 |
| Butanol (99,3) | 45,9 ± 0,35 |
| Isopropanol (99,3) | 68,0 ± 7,02 |
| Hexano ^b (99,3) | 25,5 ± 2,31 |
| Tolueno ^c (99,3) | 1,10 ± 0,00 |
| Glicerol (50,0) | 104 ± 8,95 |
| Metanol | |
| (1,00) | 110 ± 1,58 |
| (2,00) | 110 ± 0,35 |
| (5,00) | 104 ± 6,84 |
| (10,0) | 95,0 ± 2,11 |
| (25,0) | 96,0 ± 0,70 |
| (50,0) | 61,5 ± 7,02 |
| (99,3) | 18,7 ± 0,88 |
| Etanol | |
| (1,00) | 107 ± 1,05 |
| (2,00) | 102 ± 0,00 |
| (5,00) | 86,7 ± 5,44 |
| (10,0) | 82,3 ± 4,04 |
| (25,0) | 32,4 ± 0,18 |
| (50,0) | 47,6 ± 2,81 |
| (99,3) | 37,2 ± 2,46 |

Fonte: próprio autor

^a 1h a 30°C. pNPP usado para determinar a atividade de lipase (item 4.2.4).

^b Evaporação completa a temperatura ambiente por 4,5h.

^c Evaporação completa a temperatura ambiente por 30h.

A lipase de *B. ribis* EC-01 se manteve estável na presença de até 25% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de etanol, mantendo mais de 82% de sua atividade inicial. A lipase de *Rhizopus oryzae* em presença de 30 % (v/v) de metanol e etanol exibiu, respectivamente, 2 e 33 % de sua atividade inicial depois de 1 hora de incubação a 25 °C (HIOL et al., 2000). Saxena et al. (2003) relataram para a lipase de

Aspergillus carneus atividade residual de 59,2e 55,3 % em 40% de metanol e etanol, respectivamente, após 30 minutos de incubação. Similarmente, a lipase de *B. ribis* EC-01 reteve 61,5% e 47,6% de sua atividade inicial incubada em 50 % (v/v) de metanol e etanol, respectivamente, após 1 h de incubação.

Esta lipase também se mostrou estável na presença de 50% (v/v) de glicerol, mantendo sua atividade total, e, baixa estabilidade em solventes imiscíveis a 99,3 % (v/v), mantendo 25,5% de sua atividade inicial em presença de hexano e 1,10 % em tolueno.

5.2.4 Determinação de K_M aparente e $V_{máx}$

Os ésteres de ácidos graxos de cadeia curta, média e longa foram avaliados quanto a especificidade desta lipase pelo substrato. Os ésteres incluíram acetato, butirato, caproato, caprato, palmitato e estearato de *p*-nitrofenila (Tabela 23).A Figura 28 apresenta os gráficos de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk obtidos.

Tabela 23 – Valores de K_M aparente e $V_{máx}$ para a lipase livre de *Botryosphaeria ribis* EC-01

| Substratos ^a | Atividade ^b (U/mL) | K_M aparente ^b (mM) | $V_{máx}$ ^b U/mL | $V_{máx}$ ^b (μ mol/min mg) |
|--|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|--|
| acetato de <i>p</i> -nitrofenila (C:2) ^c | 0,0800 \pm 0,04 | 3,20 \pm 0,78 | 3,50 \pm 0,30 | 15,4 \pm 1,34 |
| butirato de <i>p</i> -nitrofenila (C:4) | 4,48 \pm 0,35 | 0,972 \pm 0,11 | 5,26 \pm 0,13 | 23,2 \pm 0,59 |
| caproato de <i>p</i> -nitrofenila (C:6) | 0,180 \pm 0,02 | 0,943 \pm 0,35 | 0,140 \pm 0,01 | 0,640 \pm 0,05 |
| caprato de <i>p</i> -nitrofenila (C:10) | 4,47 \pm 0,47 | 0,819 \pm 0,22 | 7,01 \pm 0,43 | 30,9 \pm 1,90 |
| palmitato de <i>p</i> - nitrofenila (C:16) | 35,5 \pm 0,57 | 0,372 \pm 0,08 | 24,3 \pm 0,92 | 107 \pm 4,09 |
| estearato de <i>p</i> - nitrofenila (C:18) | 24,3 \pm 0,61 | 0,512 \pm 0,18 | 22,2 \pm 1,56 | 97,9 \pm 6,88 |

Fonte: próprio autor

^a Em solução aquosa.

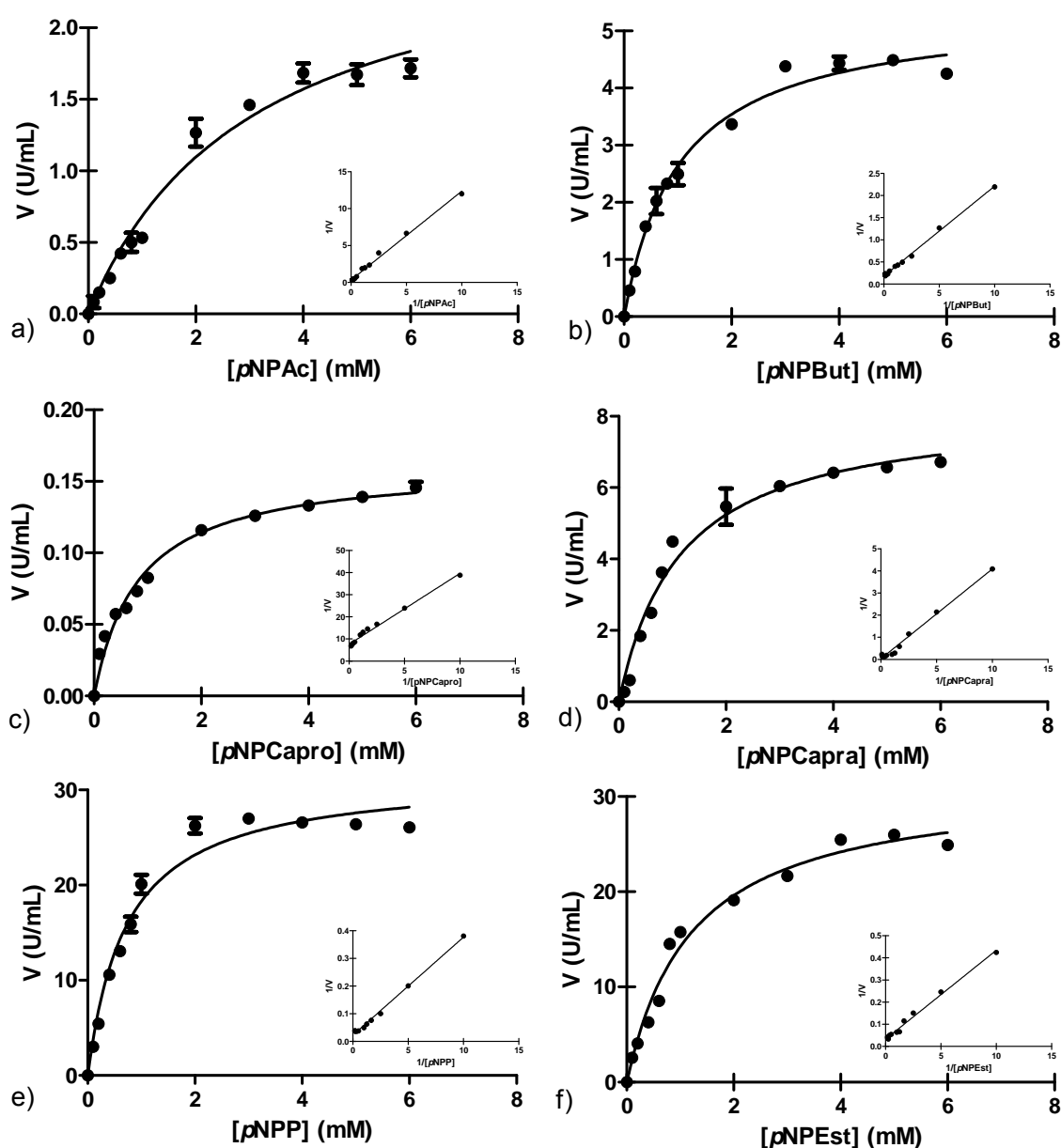
^b Os ésteres de *p*-nitrofenila foram testados como substratos na condição padrão (item 4.2.4).

^c Cadeia carbônica em parênteses.

Os resultados mostraram que a lipase de *B. ribis*EC-01 hidrolisou todos os ésteres testados, mas com intensidades diferentes, tendo maior especificidade para ésteres de ácidos graxos de cadeia longa.A atividade foi menor

para o acetato de *p*-nitrofenila ($0,08 \pm 0,04$ U/mL) e aumentou com o acréscimo da cadeia, como para o palmitato de *p*-nitrofenila ($35,5 \pm 0,57$ U/mL). A atividade relativa (%) para os substratos de cadeia C2, C4, C6, C10, C16 e C18 foram $0,22 \pm 0,10$, $12,6 \pm 0,98$, $0,46 \pm 0,09$, $12,6 \pm 1,31$, $100,0 \pm 1,59$ e $68,3 \pm 1,72$, respectivamente.

Figura 28 - Gráficos de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk que mostram a tendência hipérbola retangular característico de Michaelis-Menten e suas transformações lineares do a) acetato, b) butirato, c) caproato, d) caprato, e) palmitato e f) estearato de *p*-nitrofenila.



Fonte: próprio autor

Resultados semelhantes ao da lipase de *B. ribis* EC-01 foram observados para a lipase de RL74, produzida por *Ralstoniasp* (YOO et al., 2011), *Streptomyces* sp. CS326 (CHO et al., 2012) e *Pseudomonas aeruginosa* PseA (GAUR et al., 2008), que preferiram o éster de cadeia longa palmitato de *p*-nitrofenilacomo substrato.

Também na Tabela 23 estão apresentados os resultados de K_M aparente e $V_{m\acute{a}x}$ para o extrato bruto da lipase de *B. ribis* EC-01 calculado pelo gráfico de Michaelis-Menten para estes mesmos substratos. Valores baixos de K_M representam uma alta afinidade por um substrato específico. Os valores de K_M entre enzimas variam bastante, mas para a maioria das enzimas industrialmente utilizadas o valor está entre 10^{-1} a 10^{-5} M (SHARMA et al., 2001).

A lipase de *B. ribis* EC-01 demonstrou alta afinidade pelo palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) com um K_M de $0,37 \pm 0,08$ mM e $V_{m\acute{a}x}$ de $107 \pm 4,09$ μ mol/min mg, sendo, portanto, considerada uma lipase verdadeira (JAEGER e EGGERT, 2002). Para este mesmo substrato as lipases de *Streptomyces* sp. CS326 (CHO et al., 2012) e *Pseudomonas aeruginosa* PseA (GAUR et al., 2008) exibiram K_M e $V_{m\acute{a}x}$, respectivamente de 0,24 mM e 4,6 mM/min mg e 71,4 mM e 2,24 μ mol/min mg. A lipase de *Fusarium solani* obteve K_M e $V_{m\acute{a}x}$ de 1,8 mM e 1,7 μ mol/min mg, respectivamente para *o p*NPP (MAIA et al., 2001). Ye et al. (2005) reportaram valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ de 0,45 mM e 46,4 μ mol/min mg, respectivamente, quando *p*NPP foi o substrato para a lipase comercial de *Candida rugosa*.

5.3 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *BOTRYOSPHERIA RIBIS* EC-01

A lipase de *B. ribis* EC-01, como descrito na parte experimental deste trabalho, foi imobilizada em diversos suportes utilizando diferentes métodos de ativação e de imobilização. O principal objetivo foi obter um derivado estável, sem que sua atividade seja afetada durante a imobilização para aplicação na síntese de biodiesel.

A imobilização pode ser realizada pelo simples contato da enzima com o suporte, como é o caso da adsorção, ou pode requerer o uso de aditivos, como é o caso do glutaraldeído, que estabiliza a interação enzima/suporte, ligando-se covalentemente. Sendo assim, um material orgânico poroso composto

basicamente por carbono (carvão ativo), um material inorgânico poroso, composto por SiO₂ (Celite 545[®]) e um polímero natural obtido da quitina (quitosana) foram estudados como suportes para imobilização. Estes suportes foram utilizados em sua forma natural (carvão, Celite), e com adição algum agente ativador (carvão, quitosana em pó e esferas), como explica a Tabela 9.

Primeiramente, uma seleção do carvão ativado comercial a ser utilizado foi realizada, e então, o carvão selecionado e os demais suportes foram avaliados quanto à capacidade de reter a proteína e a atividade oferecida em diferentes tempos de imobilização e temperatura (no caso da adsorção). Os resultados foram expressos em termos de eficiência de imobilização e porcentagem de enzima ligada, que são comparações da atividade enzimática e concentração de proteína, respectivamente, presentes no sobrenadante antes e após o contato com o suporte (equações 4 e 5).

Os resultados de porcentagem de proteína ligada e eficiência de imobilização serão apresentados por tópicos separados a seguir (Tabelas 25-27) e a comparação entre as atividades dos imobilizados será apresentada na Tabela 28 no final do item 4.3.

5.3.1 Seleção do Carvão Ativado Comercial

Os estudos preliminares de imobilização desta lipase envolveram dois suportes potenciais, um carvão ativado comercial obtido de coco (GAC-LB) e outro de madeira (GAC-LC). Algumas propriedades destes dois suportes estão na Tabela 24.

Nesta etapa de seleção do carvão, por conter muitas variáveis, somente a quantidade de proteína ligada foi determinada pelo decréscimo do teor proteico após o contato da solução enzimática com o suporte pela equação 4.

As Figuras 28 e 29 exibem os resultados obtidos de imobilização da lipase de *B. ribis* EC-01 nestes dois suportes e análise de variância e teste de Tukey ao nível de 5% também foram realizados.

Tabela 24 – Propriedades do Carvão ativado de coco (GAC-LB) e madeira (GAC-LC) Crosscarbo 12 x 40 (Cross Filter Brasil Ltda.) fornecidas pelo fabricante

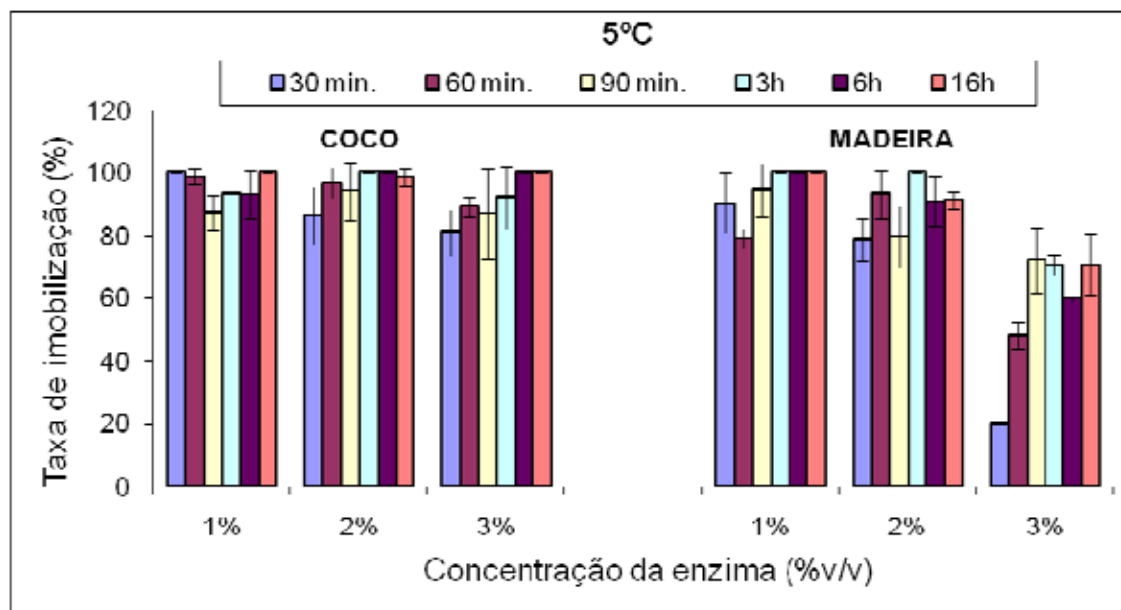
| Propriedades | GAC – LC (MADEIRA) | GAC – LB (COCO) |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Área interna (BET) | 1000 m ² /g (min.) | 1000 m ² /g (min.) |
| Densidade aparente | 0,30 ± 0,05 g/ cm ³ | 0,45 ± 0,05 g/ cm ³ |
| Índice de iodo | 900 mg/g (min.) | 950 mg/g (min.) |
| Umidade | 8,0 % (máx.) | 8,0 % (máx.) |
| Dureza (ro-tap) | 75 % (min.) | 95 % (min.) |
| Granulometria | 12 x 40 mesh | 12 x 40 mesh |

Fonte: fabricante

A média de adsorção da lipase de *B. ribis*EC-01 foi maior ($p < 0,05$) a 5 °C (Figura 29) em ambos os suportes quando comparada com a média obtida a 25 °C (Figura 30). O suporte GAC – LB (COCO), em alguns experimentos proporcionou maior rendimento de imobilização, porém na maioria, a diferença não foi significativa. Observou-se que a adsorção foi dependente da concentração de lipase adicionada, ou seja, quando a concentração utilizada foi mais baixa (1%), não houve diferença significativa entre os suportes, entretanto, com maiores concentrações de lipase (2 e 3 %) houve diferença. O tempo de contato enzima/substrato não foi significativo para alterar o padrão de imobilização desta lipase. Portanto, um tempo de imobilização reduzido (30 min) foi suficiente para adsorver 100% da lipase no suporte GAC – LB (COCO), independentemente da concentração da enzima.

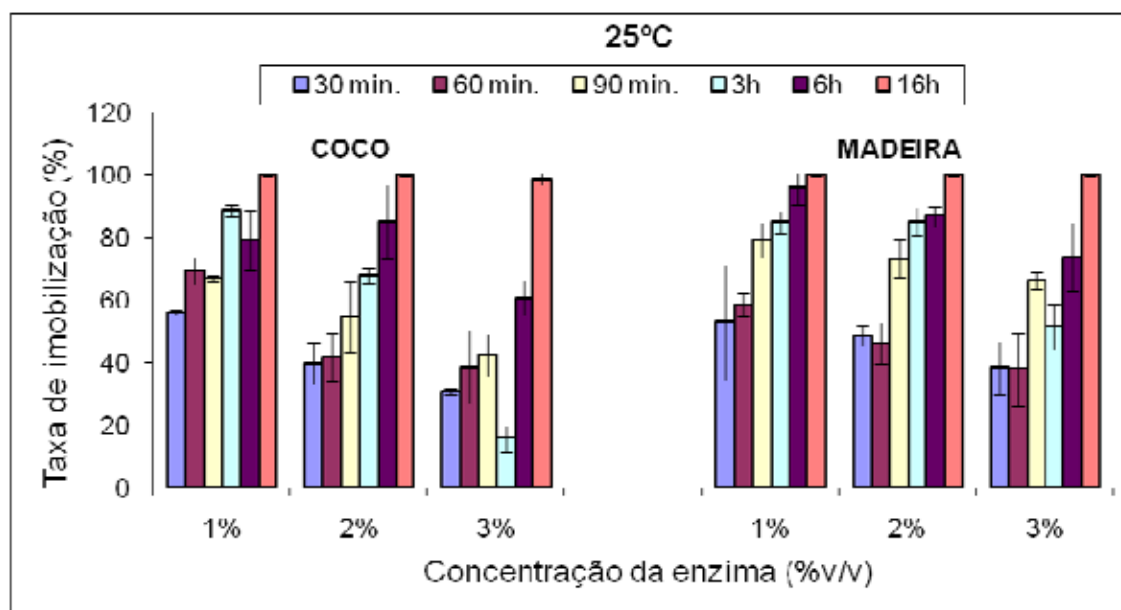
Algumas características físico-químicas (Tabela 24) destes materiais podem explicar a maior eficiência do carvão GAC-LB (COCO) no processo de imobilização. O sucesso e eficiência deste processo dependem de vários parâmetros como o tamanho da proteína, área superficial do adsorvente e, principalmente, a porosidade e tamanho dos poros (VILLENEUVE et al., 2000).

Figura 29 – Imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis*EC-01 nos suportes GAC-LB (COCO) E GAC-LC (MADEIRA) a 5°C



Fonte: próprio autor

Figura 30 – Imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis*EC-01 nos suportes GAC-LB (COCO) E GAC-LC (MADEIRA) a 25°C.



Fonte: próprio autor

Os carvões GAC-LB (COCO) E GAC-LC (MADEIRA) se diferem quanto à densidade aparente, índice de iodo e dureza (Tabela 24). A densidade aparente é a relação entre a massa seca do carvão e o seu volume, incluindo seu volume de poros e espaços interpartículas. O carvão GAC-LC (MADEIRA) apresentou menor valor ($0,30 \pm 0,05$) tendo, portanto, maior porosidade geral.

Entretanto o índice de iodo do carvão GAC-LB (COCO) foi maior (950 mg/g). Este dado é definido como a quantidade em miligramas de iodo de uma solução aquosa, adsorvida por 1 grama de carvão ativado. O índice de iodo fornece a porosidade relativa aos pequenos poros, sendo uma característica desejável. Além disso, o GAC-LB (COCO) teve dureza superior (95% contra 75%). Esta é uma característica importante para a utilização deste material na imobilização de enzimas, considerando que quanto maior este valor, menor será a fragmentação deste suporte durante o processo de imobilização, podendo até ser reutilizado.

Menoncin et al. (2009) relataram uma eficiência de imobilização de 30,4 % para uma lipase de *Penicillium verrucosum* em 2h a 5 °C. Uma lipase comercial de *Candida antarctica* B foi imobilizada em carvão ativado granular, sintetizado a partir de casca de coco, e também em carvão ativado comercial de tecidos, tendo sido obtido uma imobilização de até 95% a 25°C (NARANJO et al., 2010). Portanto, a imobilização da lipase de *B. ribis* EC-01 obtida foi bastante eficiente no carvão GAC – LB (COCO) em 30 minutos a 5 °C quando comparado com os resultados obtidos na literatura científica.

O carvão GAC-LB (COCO) foi selecionado para dar continuidade aos estudos, juntamente com os demais suportes, agora sendo chamado de Carvão Ativado de Coco (CAC). Estudos de ativação utilizando este suporte foram conduzidos e novos parâmetros foram determinados.

5.3.2 Imobilização em Carvão Ativado de Coco com Agentes Ativadores

O CAC pré-selecionado anteriormente como o melhor carvão ativado foi ativado com 3% de glutaraldeído e pelo método binário (Ting et al., 2006). Os resultados obtidos na imobilização da lipase de *B. ribis* EC-01 com estes materiais estão apresentados na Tabela 25.

Pode-se observar que ambos os métodos de ativação não proporcionaram aumento na quantidade de proteína ligada em relação ao CAC sem agente ativador. Somente houve uma melhora na eficiência de imobilização do CAC ativado com EDC e GA, devido à possibilidade de mais moléculas de enzimas serem incorporadas.

Tabela 25 – Parâmetros determinados para a imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em carvão ativado de coco

| Suporte | Agente ativador | Proteína ligada (%) | Eficiência de imobilização (%) |
|---------|-----------------|---------------------|--------------------------------|
| | - | 99,7 | 81,7 |
| CAC | 3 % GA | 36,9 | 76,5 |
| | EDC + GA | 44,8 | 89,8 |

Fonte: próprio autor

5.3.3 Imobilização em Celite 545[®]

A imobilização com Celite também se dá por adsorção, que é uma técnica muito utilizada devido à facilidade, custos mais baixos e as forças fracas entre a enzima e o suporte que causam pouco efeito sobre a atividade da enzima (BALCÃO et al., 1996; VILLENEUVE et al., 2000).

Os resultados obtidos de imobilização da lipase de *B. ribis* EC-01 em Celite nas temperaturas de 5 e 25 °C se encontram na Tabela 26. A temperatura de 5 °C promoveu uma imobilização mais rápida já que em 1 h, 98,7 % da proteína oferecida foi ligada com eficiência de imobilização de 94,7 %. A imobilização realizada na temperatura de 25 °C apresentou resultados semelhantes, mas em apenas 16h. Esta pequena diferença na adsorção da proteína no suporte, nestas duas temperaturas, pode ser devido às fracas interações envolvidas que ficam suscetíveis a mudanças de temperatura.

Tabela 26 – Parâmetros determinados para a imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em Celite

| Suporte | Temperatura (°C) | Tempo (h) | Proteína ligada (%) | Eficiência de imobilização (%) |
|---------|------------------|-----------|---------------------|--------------------------------|
| Celite | 5°C | 1 | 98,7 | 94,7 |
| | | 16 | 98,4 | 92,1 |
| | 25°C | 1 | 94,7 | 94,2 |
| | | 16 | 99,7 | 93,0 |

Fonte: próprio autor

Ghamgui et al. (2004) na imobilização da lipase de *Rhizopus oryzae* em Celite conseguiram eficiência de imobilização de 66,17 % após 1h a 4 °C. Na imobilização da lipase de *Aspergillus niger* em Celite, o valor de 90,2 % de

proteína ligada foi alcançado depois de 12 h de reação. Portanto, os resultados obtidos na imobilização da lipase de *B. ribis* EC-01 em Celite com 1 h de reação foram satisfatórios em ambas as temperaturas.

5.3.4 Imobilização em Quitosana

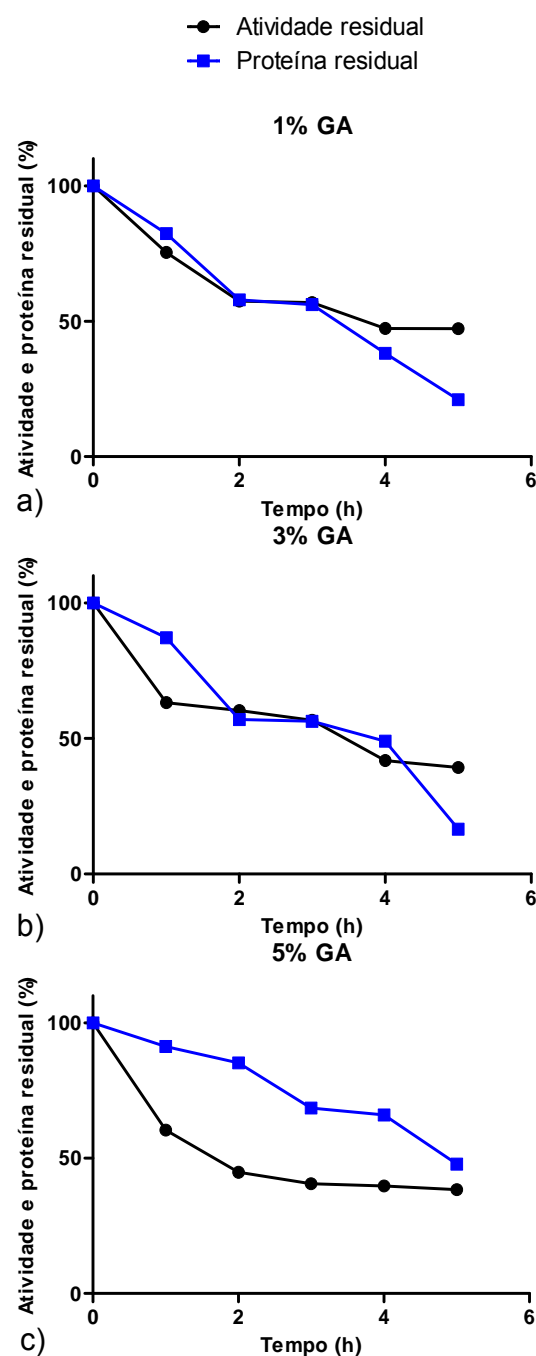
Neste trabalho a imobilização com a quitosana foi testada em duas formas, em esferas (QE) e em pó (QP), e também foram testados dois agentes bifuncionais, o glutaraldeído (GA) e o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC).

Na Figura 31 encontram-se os resultados da cinética de imobilização da quitosana em esferas (QE) ativada com 1, 2 ou 3 % (v/v) de glutaraldeído (GA). Não só o decréscimo do teor proteico no sobrenadante foi considerado, mas também a atividade hidrolítica residual presente no sobrenadante durante a imobilização.

A cinética de imobilização da lipase de *B. ribis* EC-01 em QE ativada com GA mostrou que no final de 5 h houve decréscimo da atividade e da proteína adicionada nas três concentrações de GA avaliadas. Entretanto o decréscimo proteico foi maior nos suportes ativados com 1 e 3 % (v/v) de GA. Com relação ao decaimento da atividade hidrolítica no sobrenadante as concentrações 3 e 5 % (v/v) tiveram resultados semelhantes restando cerca de 40 % da atividade inicial após 5 h de reação.

A Tabela 27 exhibe os resultados de porcentagem de proteína ligada e eficiência de imobilização para as duas formas de quitosana avaliadas e seus agentes de ativação. Em relação à quitosana em esferas (QE) ativada com glutaraldeído (GA), as concentrações de 1 e 3 % (v/v) proporcionaram maiores quantidade de proteína ligada ao final das 5 horas de contato com, respectivamente, 79 e 83% em comparação com os 52 % alcançados com 5 % (v/v) de GA. Mas, em relação à eficiência de imobilização, ao final de 5 horas, 3 e 5 % (v/v) de GA obtiveram resultados semelhantes, em torno de 60 % da atividade foi imobilizada.

Figura 31– Cinética de imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em quitosana em esferas ativadas com (a) 1 %, (b) 3 % e (c) 5 % (v/v) de glutaraldeído (GA). Atividade e proteína residual no sobrenadante.



Fonte: próprio autor

O controle da ativação do suporte com o GA é muito importante, pois dependendo de sua concentração, monômeros ou dímeros de GA podem ser formados. Esses termos referem-se à quantidade de moléculas de GA presentes por amina primária do suporte a ser ativado: em monômeros, os grupamentos amino incorporam cada um somente uma molécula de GA e em dímeros incorporam duas

moléculas. Este controle pode ser feito através da concentração do ativador, tempo de contato suporte/ativador e também força iônica da solução. Em situações drásticas (por exemplo, pH acima de 8 e altas concentrações de GA) há um descontrole da reação gerando a polimerização do GA na solução (BETANCOR et al., 2006). No caso da imobilização com *B. ribis* EC-01 tampão fosfato pH 8 foi utilizado e o tempo da reação, assim como a quantidade de GA também foram monitorados.

Tabela 27 – Parâmetros determinados para a imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em quitosana em esferas e em pó

| Suporte | Agente ativador | Proteína ligada (%) | Eficiência de imobilização (%) |
|---------|-----------------|---------------------|--------------------------------|
| QE | 1 % GA | 78,7 | 52,8 |
| | 3 % GA | 83,4 | 60,7 |
| | 5 % GA | 52,0 | 61,7 |
| | EDC + GA | 41,1 | 56,7 |
| QP | 0,25 % GA | 24,3 | 97,3 |
| | 3 % GA | 27,2 | 98,0 |
| | EDC + GA | 25,4 | 98,1 |

Fonte: próprio autor

GA: Glutaraldeído; EDC: N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida;

QE: Quitosana em Esferas; QP: Quitosana em Pó

Não se sabe ao certo a estrutura exata formada pela ligação do GA com o suporte, mas polímeros, monômeros e dímeros de glutaraldeído em diferentes superfícies têm sido relatados estarem presentes (MIGNEAULT et al., 2004). Os monômeros e dímeros têm sido relatados com reatividades diferentes: o dímero consegue imobilizar proteínas mais rapidamente através de ligação covalente direta e o monômero produz uma taxa de imobilização mais lenta (BETANCOR et al., 2006).

Então, considerando o exposto acima, o experimento com a lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em quitosana ativada com 3% (v/v) de GA pode ter obtido uma imobilização mais eficiente provavelmente devido à ativação ter formado um dímero de GA. Isto porque em apenas 2 h de contato suporte/solução enzimática, metade da proteína oferecida foi ligada e com eficiência de imobilização de quase 50%, comportamento não observado para as demais concentrações. Além disso, segundo Betancor et al. (2006), estas duas formas do GA no suporte possuem

diferenças na estabilidade. O monômero produz um braço espaçador menor, dando maior rigidez, e, o dímero produz um braço espaçador mais longo, permitindo reação com mais grupos e portanto, obter melhores resultados.

Assim, considerando o suporte QE, quando a lipase de *B. ribis* EC-01 foi imobilizada neste suporte ativado com 3 % (v/v) de GA, apresentou os melhores resultados e este sistema foi o escolhido para os testes posteriores de imobilização em esferas de quitosana.

Os testes de imobilização com a QP foram realizados com ativação do material com 0,25% e 3% (v/v) de GA. Ao final de 7 h de reação foram alcançados para estas duas concentrações de GA, respectivamente 24,3 e 27,2 % de proteína ligada. Entretanto, a eficiência de imobilização foi maior do que a encontrada com a QE ativada com GA. A QP ativada com 0,25 e 3 % (v/v) de GA conseguiram eficiência de imobilização de 97,3 e 98,0 % , respectivamente (Tabela 26). Uma β -xylosidase de *Talaromyces thermophilus* foi imobilizada em quitosana modificada com 2,5 % de GA e obteve 87 % de eficiência de imobilização e 65% de proteína ligada (GUERFALI et al., 2009). Portanto, ambas as concentrações de GA obtiveram bons resultados na imobilização da lipase de *B. ribis* EC-01 em QP, visto que o suporte foi capaz de reter quase que totalmente a atividade enzimática oferecida. Mais uma vez, uma concentração reduzida de GA (0,25 e 3 %) favoreceu a imobilização, possibilitando acesso do substrato ao sítio ativo da enzima (BUTTERFIELD et al., 2001).

Os suportesQE e QP foram ativados utilizando o método binário proposto inicialmente por Hung et al. (2003), sendo modificado por Ting et al. (2006) e os resultados também se encontram na Tabela 27. A quitosana possui além dos grupamentos amino, grupamentos hidroxila, que geralmente não são utilizados na imobilização de enzimas e, a quantidade de proteína ligada pode ser melhorada se também as hidroxilas do suporte forem utilizadas.

A imobilização binária é dividida em duas etapas: no primeiro passo, os grupos hidroxila da quitosana são ativadas com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e as moléculas de lipase se acoplam a esses grupos já ativos. No segundo passo, mais moléculas de lipase são reticuladas por meio dos grupos amina da quitosana ativadas com GA (TING et al., 2006).

A reticulação da lipase de *B. ribis* EC-01 em esferas de quitosana utilizando este método resultou em 41,1 % de proteína ligada e eficiência de

imobilização de 56,7 %. Se comparado ao outro método de ativação da quitosana avaliado utilizando somente o GA, a eficiência de imobilização foi compatível (53 – 62 %). Porém, esperava-se que a quantidade de enzima ligada fosse superior a 80%, conseguido na ativação das esferas com 3 % (v/v) de GA. Utilizando este mesmo método, Hung et al. (2003) conseguiram 25,2 % de proteína ligada para imobilização da lipase de *Candida rugosa* em quitosana em esferas.

Para a enzima imobilizada em QP, a ativação com o método binário proporcionou resultados semelhantes aos àqueles obtidos com a ativação somente com GA: eficiência de 98,1 % com retenção de 25,4 % da proteína oferecida. Isto indica que para a QP ambos os métodos foram eficientes, até mais do que para a QE.

A Tabela 28 traz comparações das atividades hidrolíticas e específicas da lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada nos suportes avaliados. A atividade específica em relação a enzima livre também foi calculada (equações 6, 7 e 8).

O preparado enzimático que proporcionou maior atividade enzimática foi o Celite com temperatura de imobilização de 5 °C e 1 h de contato. A enzima imobilizada nestas condições apresentou uma atividade de 149 U/g-suporte e atividade específica de 40,4 U/mg proteína. Esta atividade rendeu a maior atividade específica relativa à enzima livre (72,7 %). Para este mesmo suporte Chang et al. (2007) utilizando MSR, conseguiram uma atividade específica de 18,2 U/mg proteína e atividade específica relativa com a enzima livre de 34,1 % com a imobilização da lipase de *Candida rugosa* a 10,1 °C e 59,1 minutos.

Considerando a QE ativada com GA, a concentração de 3 % (v/v) apresentou os melhores resultados, com atividade de lipase de 8,45 U/g-suporte e atividade específica de 2,70 U/mg proteína (4,80 % de atividade específica relativa). A imobilização binária da QE não aumentou a atividade (1,48 U/g-suporte e 0,96 U/mg proteína). Hung et al. (2003) conseguiram para a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em esferas de quitosana, 13,8 U/g-suporte e 46,2 U/mg proteína (91,5 % em relação a lipase livre) utilizando o método binário de imobilização.

Dentre os carvões testados, as atividades da lipase imobilizada no carvão sem aditivo e no funcionalizado com o método binário foram semelhantes, 42,9 e 42,5 U/g-suporte, respectivamente, porém a atividade específica da lipase neste último foi maior (21,1 U/mg proteína). A lipase de *Pseudomonas gessardii* foi

imobilizada em um carvão ativado funcionalizado com etilenodiamina e GA e apresentou 5440 U/g-suporte de atividade (RAMANI et al., 2012).

Tabela 28 – Atividades da lipase de *Botryosphaeria rbis* EC-01 imobilizada nos diversos suportes

| Enzima (livre ou imobilizada) | Atividade (U/g- suporte ou U/mL sol. enzima) | Proteína ligada (mg/g-suporte ou mg/mL sol. enzima) | Atividade específica (U/mg- proteína) | Atividade Relativa Específica (%) |
|--------------------------------------|---|--|--|--|
| QE ¹ + 1% GA ² | 7,74 | 2,95 | 2,62 | 4,66 |
| QE + 3% GA | 8,45 | 3,13 | 2,70 | 4,80 |
| QE + 5% GA | 3,28 | 1,95 | 1,68 | 2,99 |
| QE + EDC ³ + GA | 1,48 | 1,54 | 0,96 | 1,71 |
| Livre | 10,5 | 0,187 | 56,2 | 100 |
| CAC ⁴ | 42,9 | 3,73 | 11,5 | 21,9 |
| CAC + 3% GA | 10,8 | 1,38 | 7,85 | 15,0 |
| CAC + EDC + GA | 42,5 | 2,01 | 21,1 | 40,5 |
| Livre | 9,77 | 0,187 | 52,3 | 100 |
| Celite (5°C – 1h) | 149 | 3,69 | 40,4 | 72,7 |
| Celite (5°C – 16h) | 25,3 | 3,68 | 6,88 | 12,4 |
| Celite (25°C – 1h) | 109 | 3,54 | 30,9 | 55,6 |
| Celite (25°C – 16h) | 4,26 | 3,73 | 1,14 | 2,05 |
| Livre | 10,4 | 0,187 | 55,6 | 100 |
| QP ⁵ + 0,25% GA | 34,0 | 1,14 | 29,8 | 59,5 |
| QP + 3% GA | 15,9 | 1,28 | 12,4 | 24,8 |
| QP + EDC + GA | 23,7 | 1,15 | 20,6 | 41,1 |
| Livre | 9,42 | 0,188 | 50,1 | 100 |

Fonte: próprio autor

¹Quitosana em Esferas; ²Glutaraldeído; ³N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida; ⁴Carvão Ativado de Coco; ⁵Quitosana em Pó

Em relação à imobilização com a QP, a ativada com 0,25 % de GA teve o melhor desempenho com atividade de 34,0 U/g-suporte e atividade específica

de 29,8 U/mg proteína (Tabela 28). Foresti e Ferreira (2007) utilizaram 0,025% e 0,25% (v/v) de GA na ativação da QP para imobilizar a lipase de vários microorganismos e conseguiram para estas concentrações máximo de atividade hidrolítica de 591 e 636 U/g, respectivamente.

O próximo passo foi avaliar a estabilidade da lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada nos suportes. Os imobilizados testados foram: enzima imobilizada em QE ativada com 3 % (v/v) de GA e ativada com EDC + GA; enzima imobilizada nos três tipos de carvão (CAC sem agente de funcionalização, CAC + GA, CAC + EDC + GA); a lipase imobilizada em celite a 5 °C (1 h) e nas três formas ativadas de QP.

5.4 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA LIPASE DE *BOTRYOSPHERIA RIBIS* EC-01 IMOBILIZADA

A estabilidade da enzima quando utilizada na síntese de biodiesel é a mais importante característica a ser determinada, uma vez que o ambiente em um reator de biodiesel é muitas vezes mais difícil para a enzima do que seu ambiente celular natural. As altas temperaturas e reagentes presentes podem acabar por desativar a enzima (JEGANNATHAN et al., 2008; GHALY et al., 2010).

Com o intuito de selecionar os imobilizados que apresentassem melhores características frente às condições de produção de biodiesel, a estabilidade térmica e estabilidade em diversos solventes foram determinadas.

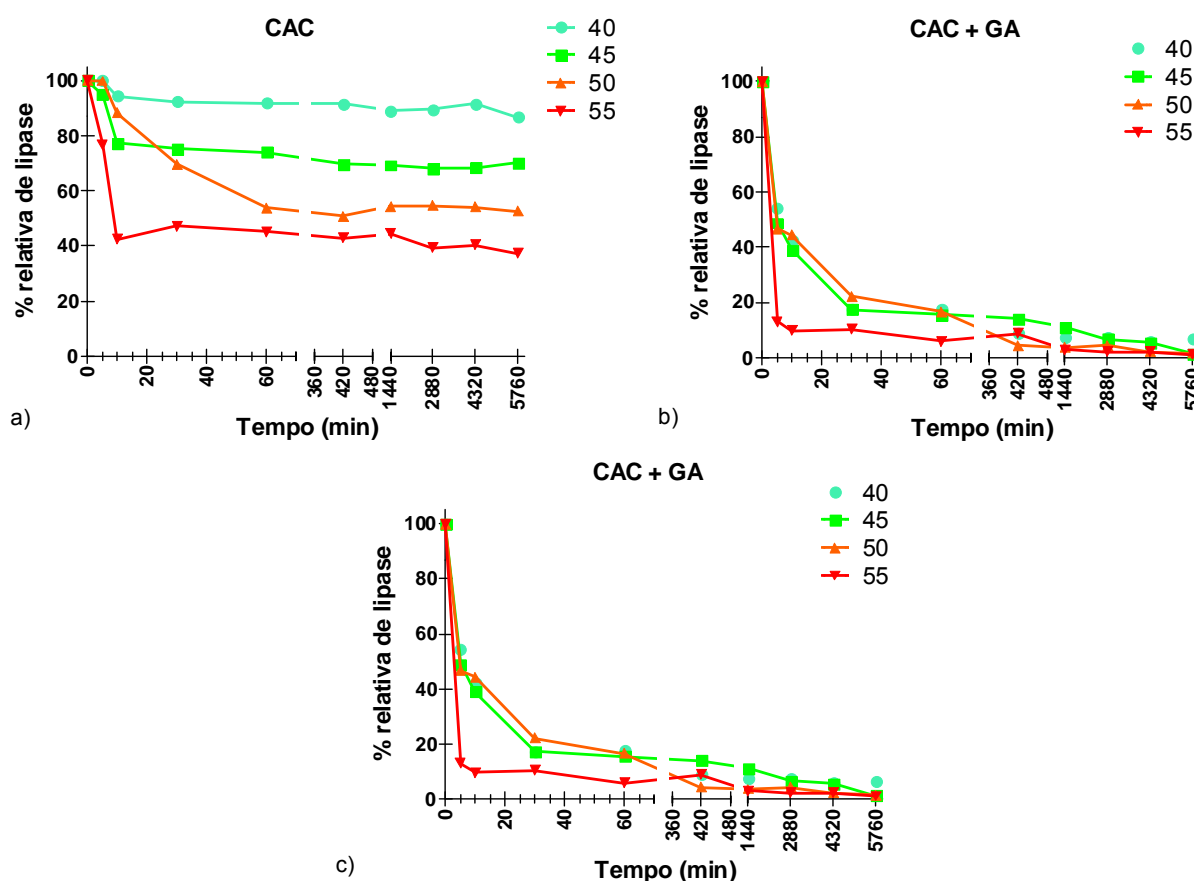
5.4.1 Estabilidade Térmica

A lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em diversos suportes foi testada em temperaturas de 40 a 55 °C, levando-se em consideração que a temperatura de produção de biodiesel utilizando a catálise enzimática normalmente está entre 30 e 55 °C (ANTCZAK et al., 2009; FJERBAEK et al., 2009; GHALY et al., 2010) e que esta lipase tem seu máximo de atividade a 55 °C.

A estabilidade térmica da lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em CAC com e sem adição de agentes funcionais durante 96 h nas temperaturas de 40 a 55 °C é apresentada na Figura 32. Como pode ser observado, a lipase imobilizada em CAC, sem agente funcional, permaneceu mais estável do que nos outros dois

suportes funcionalizados. A temperatura de 40 °C proporcionou estabilidade quase que total (87 %) para a lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em CAC durante 96 h.

Figura 32 – Estabilidade térmica da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em carvão ativado de coco (a) sem agente funcional; (b) ativado com glutaraldeído e (c) funcionalizado com EDC e glutaraldeído, durante 96 h a 40, 45, 50 e 55 °C.



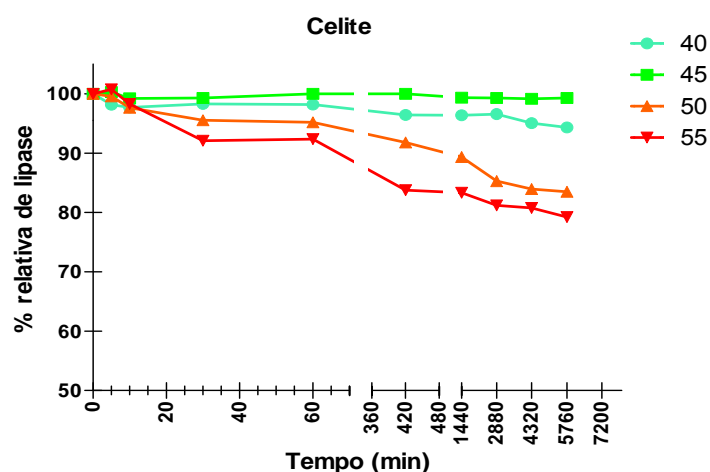
Fonte: próprio autor

A lipase de *Pseudomonas gessardii* imobilizada em carvão ativado preparado a partir de casca de arroz apresentou boa estabilidade térmica nas temperaturas de 40 e 50 °C, mantendo 85 e 80 % de sua atividade inicial, respectivamente, durante 24 h (RAMANI et al., 2010). Em temperaturas de 40 e 50 °C, a lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em CAC manteve 90 e 55 %, respectivamente, pelo mesmo período de tempo.

A estabilidade térmica da lipase imobilizada em Celite entre 40-55 °C durante 96 h foi investigada (Figura 33). Esta lipase foi ativa nas quatro temperaturas testadas durante 96 h, mantendo no mínimo 79 % de sua atividade inicial. A temperatura que proporcionou maior estabilidade para esta enzima foi a de

45 °C, pois ao final do experimento, ainda mantinha 100 % de sua atividade inicial. Os resultados ainda mostraram que a imobilização da lipase de *B.ribis* EC-01 em Celite permitiu uma maior estabilidade a 55°C, se comparada à enzima livre. Após 1h de incubação, a lipase imobilizada manteve 92% de sua atividade inicial, e pelo menos, 80% até o final do experimento (96 horas). Em sua forma livre, a lipase de *B.ribis* EC-01 reteve 82% e 64% de sua atividade inicial a 55°C, após 1 e 96 h de incubação, respectivamente.

Figura 33 – Estabilidade térmica da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em Celite durante 96 h nas temperaturas de 40, 45, 50 e 55 °C. A atividade foi determinada na condição padrão descrita no item 4.2.4.

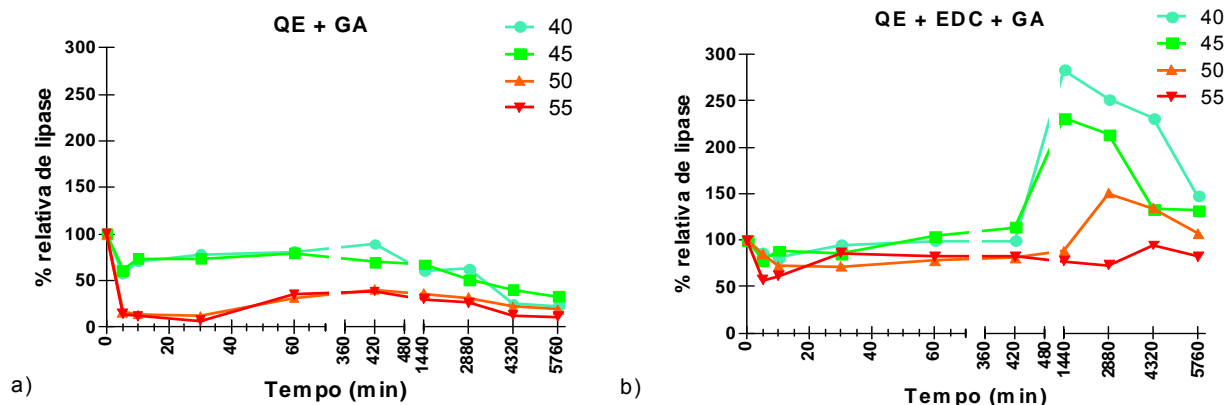


Fonte: próprio autor

Resultado semelhante foi encontrado por Liu et al. (2009a) para a lipase de *Burkholderia* sp. C20 imobilizada covalentemente em Celite que durante 1 h manteve mais de 90% de sua atividade original, mas, em seguida, gradualmente, sua atividade foi reduzida para 83% após 2 h.

Na Figura 34, é possível observar a estabilidade térmica para a lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em QE ativada pelos dois métodos avaliados. A lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em QE ativada com GA apresentou boa estabilidade nas temperaturas de 40 e 45 °C até 7 h de experimento mantendo no mínimo 70 % de sua atividade inicial. Em temperatura de 50 °C, esse sistema manteve 36 % de sua atividade inicial durante 24 h. A lipase de *Candida antarctica*, também imobilizada em QE ativada com GA reteve cerca de 20 % de sua atividade inicial nesta mesma temperatura e intervalo de tempo (RODRIGUES et al., 2008).

Figura 34 – Estabilidade térmica da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em quitosana em esferas (QE) ativada com (a) glutaraldeído (GA) e (b) EDC e glutaraldeído durante 96 h nas temperaturas de 40, 45, 50 e 55 °C.



Fonte: próprio autor

Entretanto, a lipase imobilizada em QE ativada com EDC e GA foi muito mais estável nas temperaturas de 40 e 45 °C, sendo que, com 7 h de experimento a sua atividade foi aumentada em cerca de 150 %. Este fato pode ser explicado através de duas hipóteses. O aumento na estabilidade pode ser devido a interações múltiplas entre suporte e enzima (MATEO et al., 2000). Ou ainda, devido a natureza hidrofílica da quitosana (KRAJEWSKA, 2004), ocorre inchamento durante incubação em solução de tampão fosfato. Com essa expansão, novos sítios da enzima, antes escondidos dentro da camada da quitosana, podem ser expostos, resultando em um aumento de atividade. Nas temperaturas de 50 e 55 °C este sistema também se manteve muito estável (Figura 34).

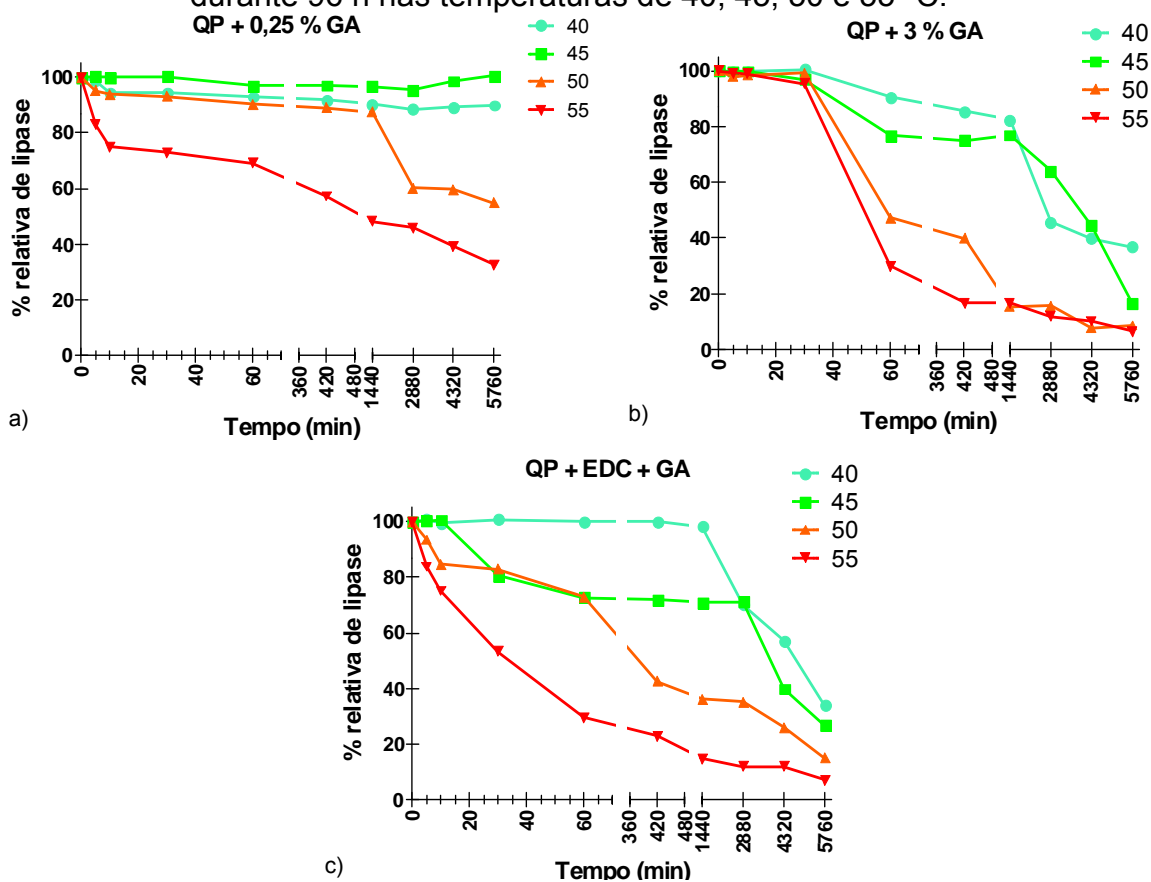
A lipase de *Candida rugosa* imobilizada em QE ativada com EDC foi testada em temperaturas variando de 25 a 60 °C durante 1 h. Esta lipase se manteve estável em temperaturas até 40 °C e em temperaturas mais altas (50 °C) cerca de 10 % de sua atividade foi perdida neste período de incubação (CHIOU; WU, 2004). A lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em QE ativada com EDC + GA, a 50 °C reteve cerca de 80 % de sua atividade inicial em 1 h de experimento e sua atividade sofreu incremento de 50 % com 48 h de incubação.

Resultados semelhantes foram encontrados por Ting et al (2006) para a lipase de *Candida rugosa* imobilizada QE funcionalizadas por EDC + GA (método binário). Durante 1 h, esta lipase se manteve estável em temperaturas de 25 a 45 °C, assim como a lipase de *B. ribis* EC-01, que nas temperaturas de 40 e 45 manteve 100 % de sua atividade inicial. Em temperaturas mais altas, 50 e 55 °C, a

lipase de *Candida rugosa* manteve 85 e 75 % de sua atividade original, respectivamente, por uma hora. A lipase de *B. ribis* EC-01, por sua vez, reteve 78 e 82 % de sua atividade inicial, respectivamente, por 1 hora, nestas temperaturas.

A lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em QP foi mais estável naquela ativada com 0,25 % (v/v) de GA, sendo que nas temperaturas de 45 e 40 °C manteve-se estável, durante 96 h, com no mínimo de 90 % de sua atividade inicial (Figura 35).

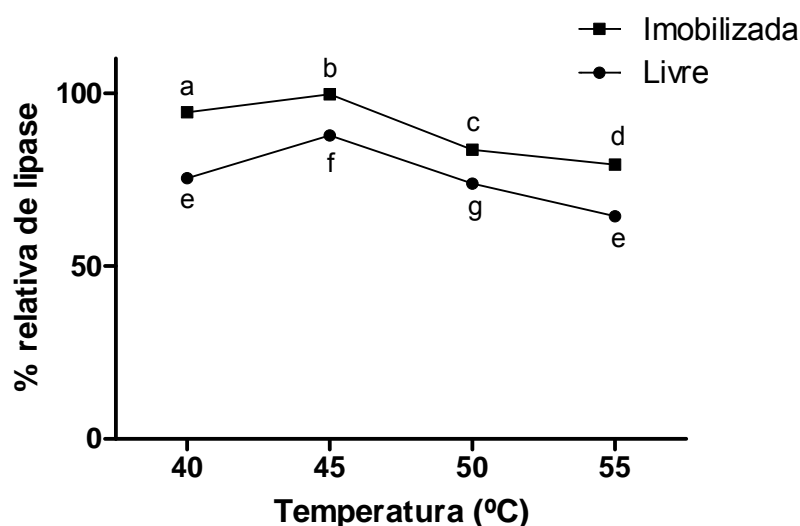
Figura 35 – Estabilidade térmica da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em quitosana em pó (QP) ativada com (a) 0,25 % (v/v) de glutaraldeído; (b) 3 % (v/v) de glutaraldeído e (c) EDC e glutaraldeído durante 96 h nas temperaturas de 40, 45, 50 e 55 °C.



imobilização em Celite foi de 18,3; 12,3; 8,67 e 14,6 %, respectivamente nas temperaturas de 40 a 55 °C.

O aumento da estabilidade térmica da enzima imobilizada esta relacionada com a sua estrutura. Este aumento pode ser atribuído a uma melhora na estabilidade física e mecânica da lipase resultantes da ligação com o suporte, que estabiliza a conformação da enzima e melhora a resistência da proteína à desnaturação térmica (LIU et al., 2009a).

Figura 36 – Comparação das estabilidades térmica da enzima livre e imobilizada em Celite a 40, 45, 50 e 55 °C¹



Fonte: próprio autor

¹letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias pelo teste de Tukey.

Visto que a enzima imobilizada em CAC, Celite, QE + EDC + GA, QP + 0,25 % GA, QP + 3 % GA e QP + EDC + GA apresentaram bons resultados de estabilidade térmica, considerando que, mantiveram no mínimo 70 % da atividade inicial durante 24 h em temperaturas de 40 a 45 °C, estes foram os sistemas estudados na estabilidade em solventes.

5.4.2 Estabilidade em Solventes

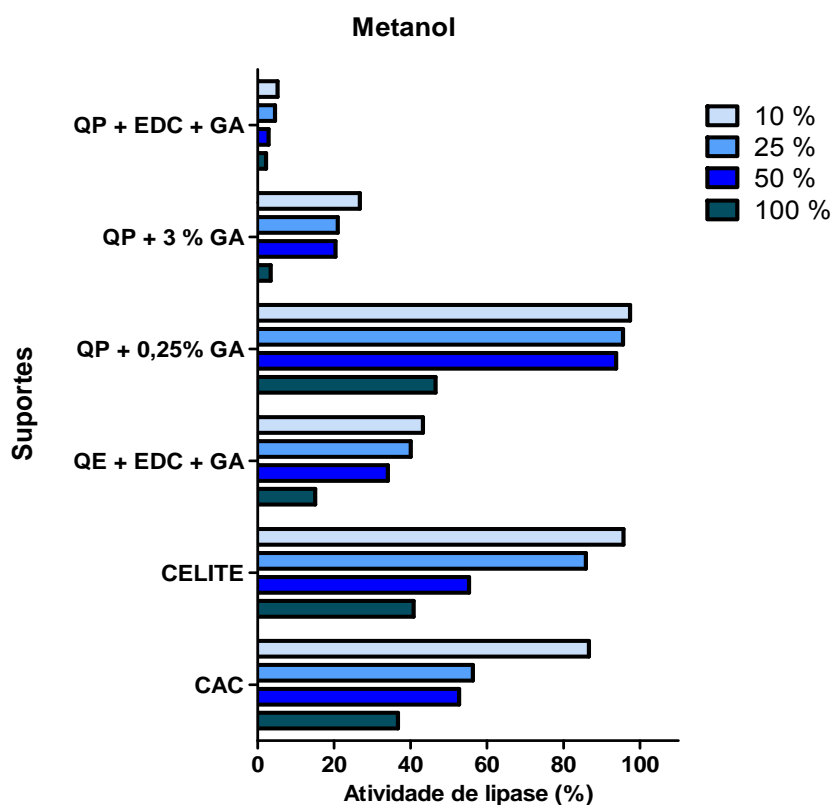
Alguns solventes usados na síntese de biodiesel como metanol, etanol e *t*-butanol foram testados para avaliar a estabilidade da lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em diversos suportes em concentrações de 10, 25, 50 e 100 % (v/v).

A Figura 37 apresenta a estabilidade das enzimas imobilizadas em metanol. A lipase imobilizada em CAC se manteve estável até 10 % (v/v) de metanol, com 87% de sua atividade mantida após 1 h de incubação. Já a enzima imobilizada em Celite foi estável até 25 % (v/v) de metanol mantendo 86 % de sua atividade inicial.

A lipase imobilizada em QP + 0,25 % GA manteve boa estabilidade (93 %) em 50 % (v/v) de metanol. Já a lipase de *B. ribis* EC-01 quando imobilizada em QE teve 40 % de sua atividade inicial preservada em 25 % (v/v) de metanol .

Os sistemas com a QP ativada com 3 % de GA e EDC + GA foram os menos estáveis em metanol, mantendo menos de 20 % a sua atividade inicial.

Figura 37 – Estabilidade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em diversos suportes em metanol a 10, 25, 50 e 100 % (v/v)

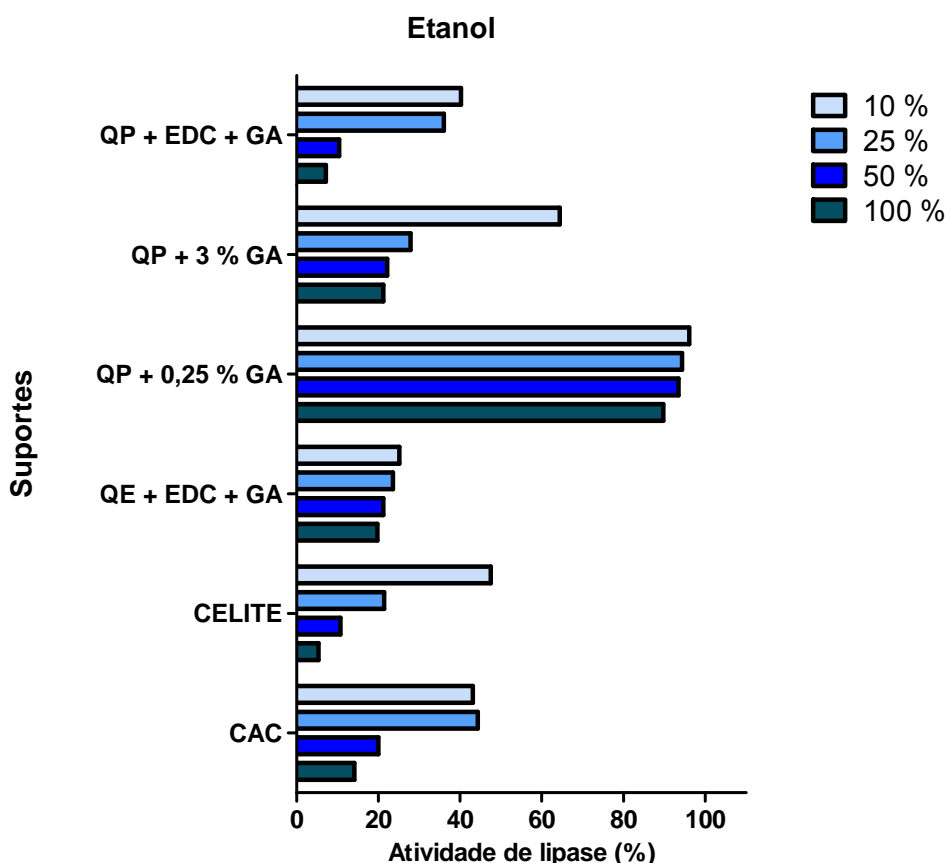


Fonte: próprio autor

A Figura 38 exibe a estabilidade dos imobilizados em etanol. Pode-se observar que a enzima imobilizada em QP + 0,25 % GA foi muito estável, mantendo no mínimo 90 % de sua atividade inicial. Porém, a lipase imobilizada em Celite e em QP + 3 % GA teve estabilidade moderada até 10 % (v/v) de etanol, mantendo 48 e 64 %, respectivamente, de suas atividades iniciais.

Para a enzima imobilizada em CAC e QP + EDC + GA cerca de 40 % de sua atividade inicial foi mantida em concentrações de 10 e 25 % (v/v). A enzima imobilizada em QE foi menos estável em etanol mantendo cerca de 20 % da atividade inicial, nas concentrações testadas.

Figura 38 – Estabilidade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em diversos suportes em etanol a 10, 25, 50 e 100 % (v/v)



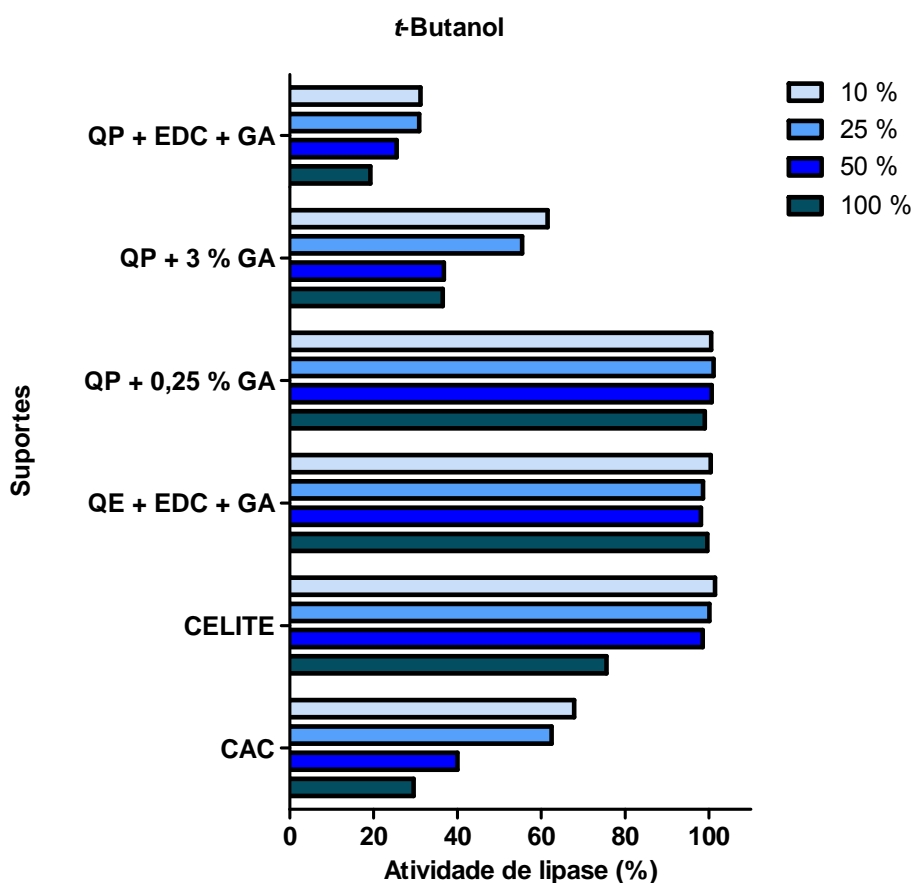
Fonte: próprio autor

O solvente *t*-butanol é um importante cossolvente nas reações de transesterificação utilizando lipases, pois ele pode eliminar o efeito negativo do metanol insolúvel presente em pequenas gotículas no óleo e também do glicerol, pois são solúveis neste solvente (HALIM; KAMARUDDIN, 2008; KUMARI et al., 2009). Existem relatos na literatura de aumento na produção de biodiesel utilizando *t*-butanol como cossolvente (LI et al., 2006; WANG et al., 2006; ROYON et al., 2007; RAITA et al., 2010).

Para o *t*-butanol, a lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em QP + 0,25 % GA, QE + EDC + GA e em Celite foi muito estável em até 100 % (v/v) deste solvente. Já a enzima imobilizada em CAC e QP + 3 % GA foi menos estável

(mantendo cerca de 60 % de suas atividades iniciais) até 25 % (v/v) de *t*-butanol (Figura 39).

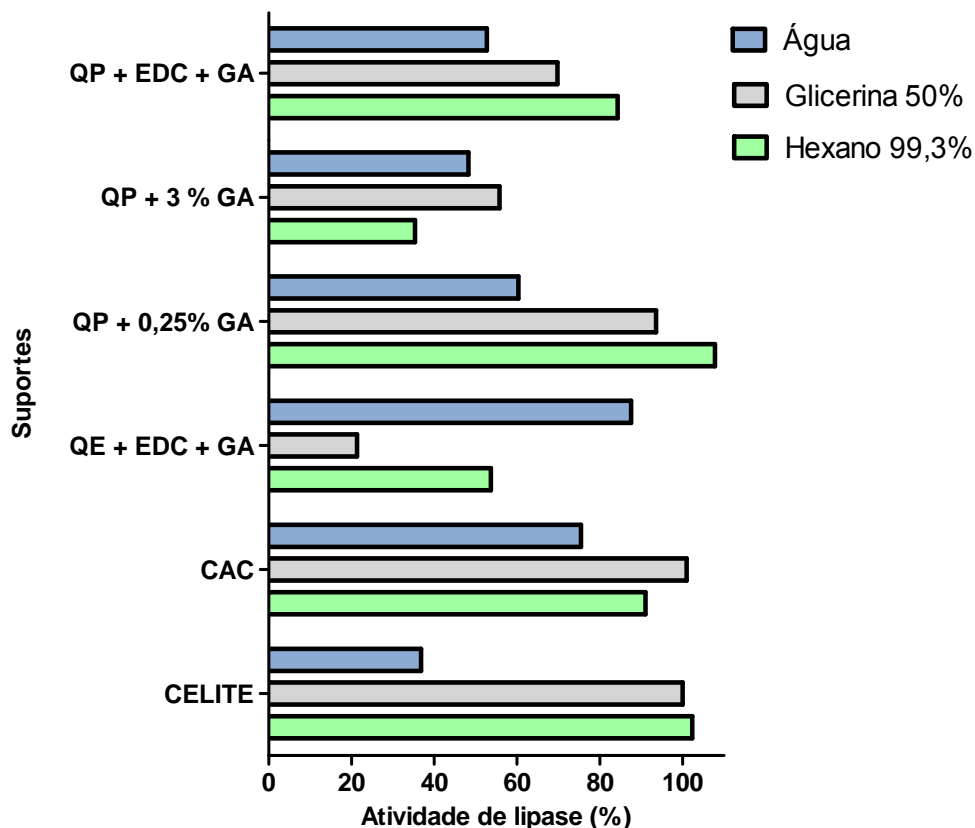
Figura 39 – Estabilidade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em diversos suportes em *t*-butanol a 10, 25, 50 e 100 % (v/v)



Fonte: próprio autor

A lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada também foi testada quanto a sua estabilidade incubada em água, glicerina (50%, v/v) e hexano (99,3 %, v/v) e os resultados estão na Figura 40. Esta lipase imobilizada nos diversos suportes teve boa estabilidade em água (Figura 39) se considerarmos que este meio era composto totalmente por água e variou de 37 % (Celite) a 88 % (QE + EDC + GA).

Figura 40 – Estabilidade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em diversos suportes em água, glicerina (50 %, v/v) e hexano (99,3 %, v/v)



Fonte: próprio autor

A estabilidade em água é um parâmetro necessário a ser determinado na enzima imobilizada, pois a reação de transesterificação utilizando lipase acontece em presença de água (ANTCZAK et al., 2009; BAJAJ et al., 2010). As lipases possuem a característica única de agirem na interface óleo-água. Essa ação é devido a alterações conformacionais da molécula de lipase, que em presença desta interface, permitem o acesso do substrato ao sítio catalítico (VERGER, 1997; REIS et al., 2009). Adicionando-se água ao meio para formar gotículas com o óleo aumenta a atividade da lipase pelo aumento de sua área interfacial disponível.

No entanto, as lipases catalisam a hidrólise em meio aquoso e um excesso de água faria da hidrólise uma reação concorrente, tornando assim, o conteúdo de água um parâmetro crítico a ser determinado, a fim de minimizar a hidrólise e aumentar a transesterificação (SHARMA et al., 2011; GHALY et al., 2010; BAJAJ et al., 2010). A quantidade de água presente é dependente do sistema utilizado, fonte de lipase, técnica de imobilização, substrato de partida, entre outros (GHALY et al., 2010). Muitos autores reportaram concentrações de 5 a 20 %

(KUMARI et al., 2007; SHA; GUPTA, 2007; LI et al., 2010; CHEN et al., 2009) como sendo a quantidade ideal de água presente no sistema em peso de óleo adicionado.

Na Figura 39 também estão apresentados os resultados de estabilidade dos imobilizados em presença de glicerina, um coproduto formado durante a reação de biodiesel (YANG et al., 2012) e o hexano, que pode ser utilizado como cossolvente.

Em geral, os imobilizados tiveram boa estabilidade em glicerina (50%, v/v) e hexano (99,3 %, v/v), mantendo no mínimo 54 % de suas atividades iniciais. Exceto para a enzima imobilizada em QE ativada com EDC e GA, que manteve 21 % de sua atividade inicial quando incubada em glicerina e para a enzima imobilizada em QP ativada com 3 % de GA que manteve 35 % de sua atividade inicial incubada em hexano.

Os resultados de estabilidade em solventes obtidos com a lipase de *B. ribis* EC-01 confirmam que as lipases apresentam maior estabilidade em solventes hidrofóbicos, pois estes solventes não conseguem retirar com facilidade a água associada à enzima, que é necessária para a sua conformação ativa. A presença de água ao redor da enzima pode manter sua estrutura tridimensional, aumentando sua atividade catalítica. Já os hidrofílicos, pode remover uma parte da água essencial a atividade da enzima, diminuindo a atividade catalítica (SZTAJER et al., 1992; VALIVETY et al., 1992).

5.5 CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE DE IMOBILIZAÇÃO

Os sistemas suporte-enzima que tiveram boa estabilidade térmica e em solventes e que serão aplicados para a produção de biodiesel foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e por espectroscopia de absorção no infravermelho (IV). Os suportes foram caracterizados antes e após a imobilização com a lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01. Os sistemas suporte-enzima analisados foram: CAC, Celite, QE + EDC + GA e QP + 0,25% GA.

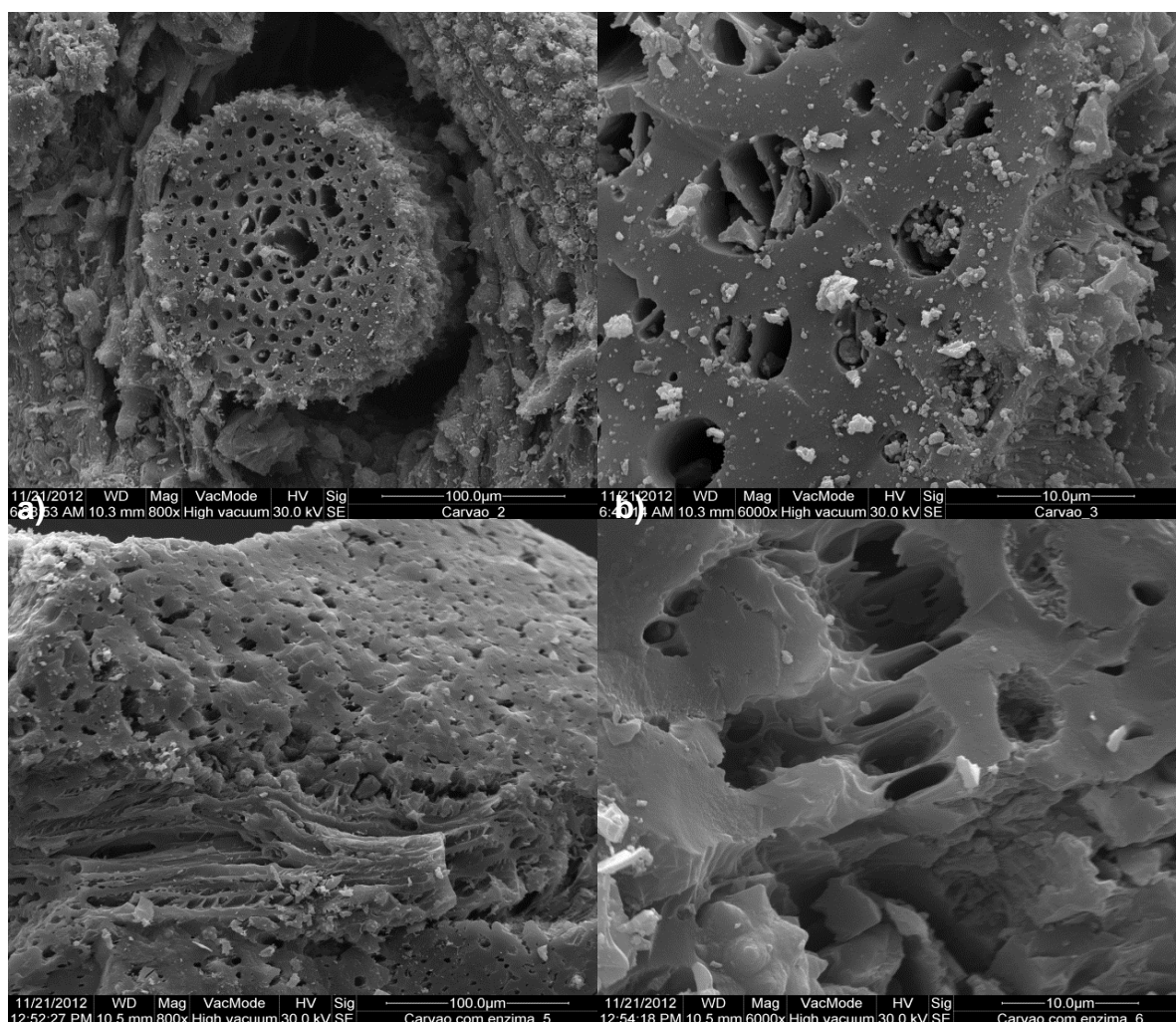
5.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Figura 41 ilustra a caracterização do suporte CAC antes e após a imobilização com a lipase de *B. ribis* EC-01. Como pode ser observado na Figura 41

a-b, o carvão possui uma superfície irregular e presença de cavidades. Na Figura 41 c-d, pode-se verificar que a superfície foi coberta, provavelmente pela proteína.

As enzimas podem preencher os poros da matriz de carbono e após o enchimento, a enzima reside na entrada destes poros e, posteriormente, na área superficial externa do poro (RAMANI et al., 2010).

Figura 41 – Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura do carvão ativado de coco (a) e (b)¹ antes e (c) e (d)¹ depois da imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01



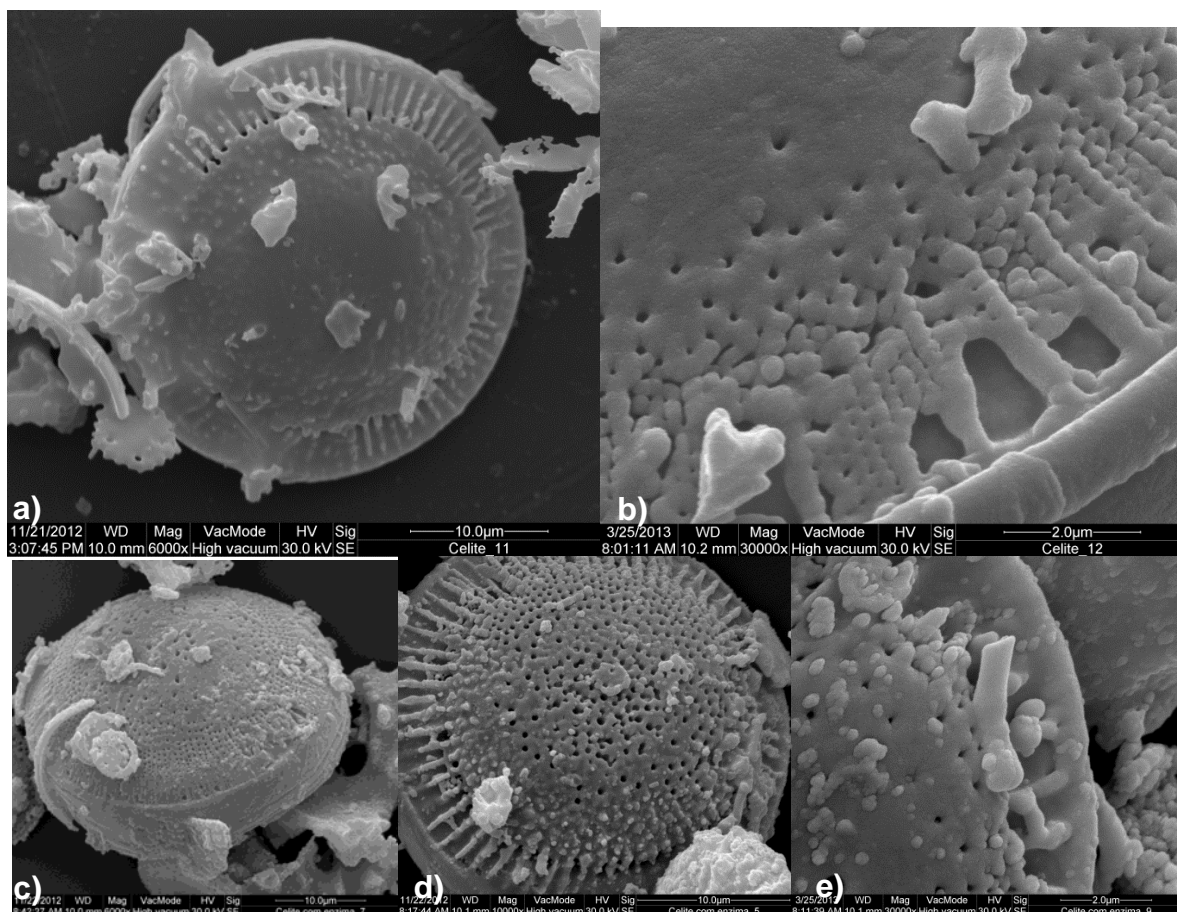
Fonte: próprio autor

¹ aumento de 10 x

A morfologia do Celite, antes e após a imobilização foi examinada (Figura 42). O Celite, também conhecido como terra diatomácea, ocorre naturalmente a partir de restos fósseis de diatomáceas que é um tipo de alga com carapaça dura. Elas são compostas por sílica e sua estrutura silicosa pode conter uma variedade de poros, costelas, espinhos, cristas marginais e elevações (TOMIN

et al., 2011). Nota-se que o suporte Celite apresenta uma superfície irregular (Figura 42a-b). Após a imobilização da lipase de *B. ribis* EC-01, a superfície do suporte foi coberta com aglomerados de proteína (Figura 42c-e).

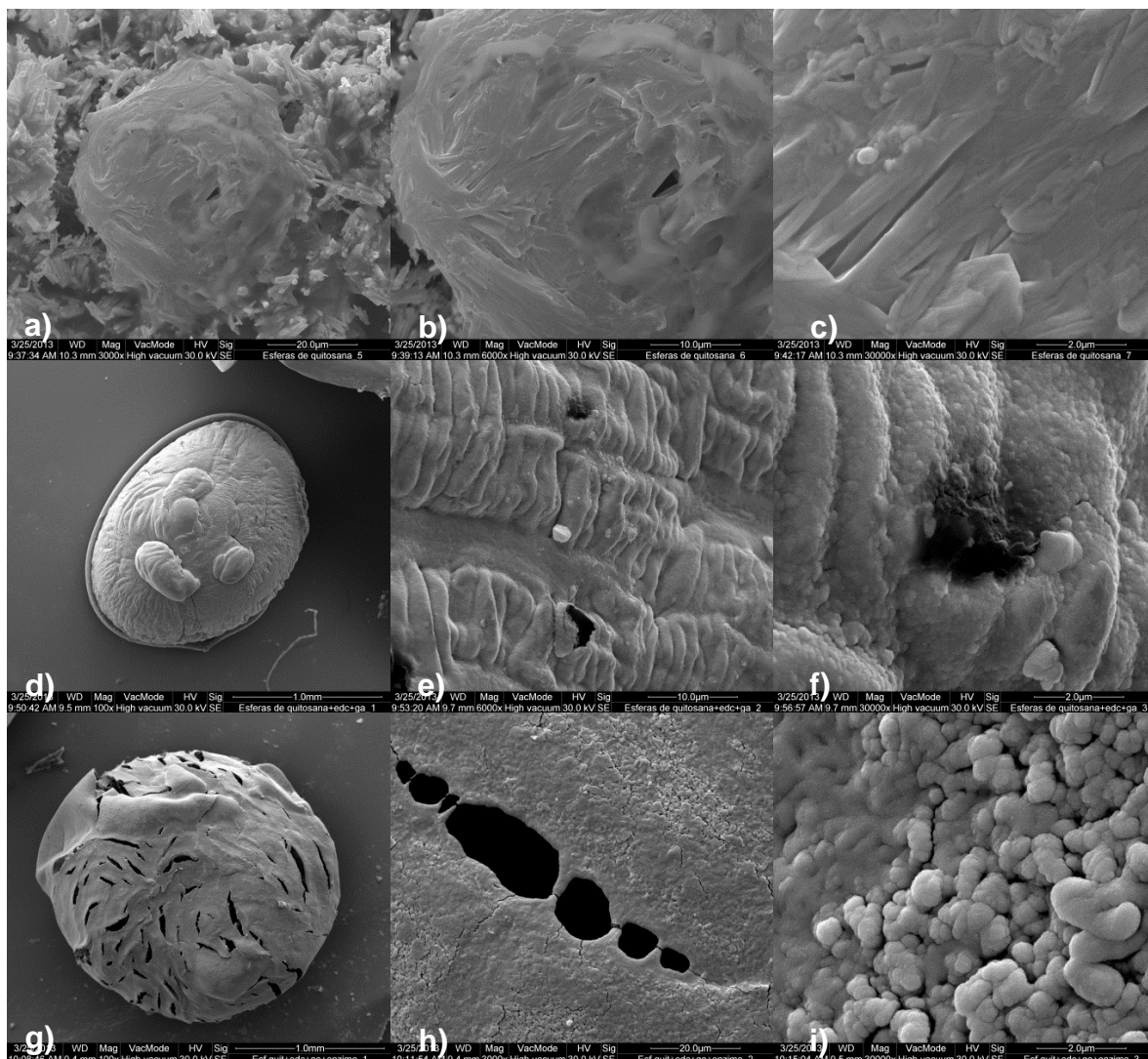
Figura 42 – Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura do Celite (a) e (b)¹ antes e (c), (d) e (e)¹ depois da imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01



Fonte: próprio autor
¹aumento de 5 x

A Figura 43 apresenta a superfície das esferas de quitosana antes e após a ativação e também após a imobilização com a lipase. Na Fig 43a-c é possível notar a superfície lisa da esfera de quitosana que após a ativação com os agentes EDC e GA (Figura 43d-f), a se tornou rugosa. O processo de imobilização (Figura 43g-i) promoveu o aparecimento de aglomerados que podem ser atribuídos à proteína.

Figura 43 – Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura das esferas de quitosana (a), (b)¹ e (c)² sem ativação (d), (e)³ e (f)⁴ ativadas com EDC e glutaraldeído e (g), (h)⁵ e (i)⁴ depois da imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01

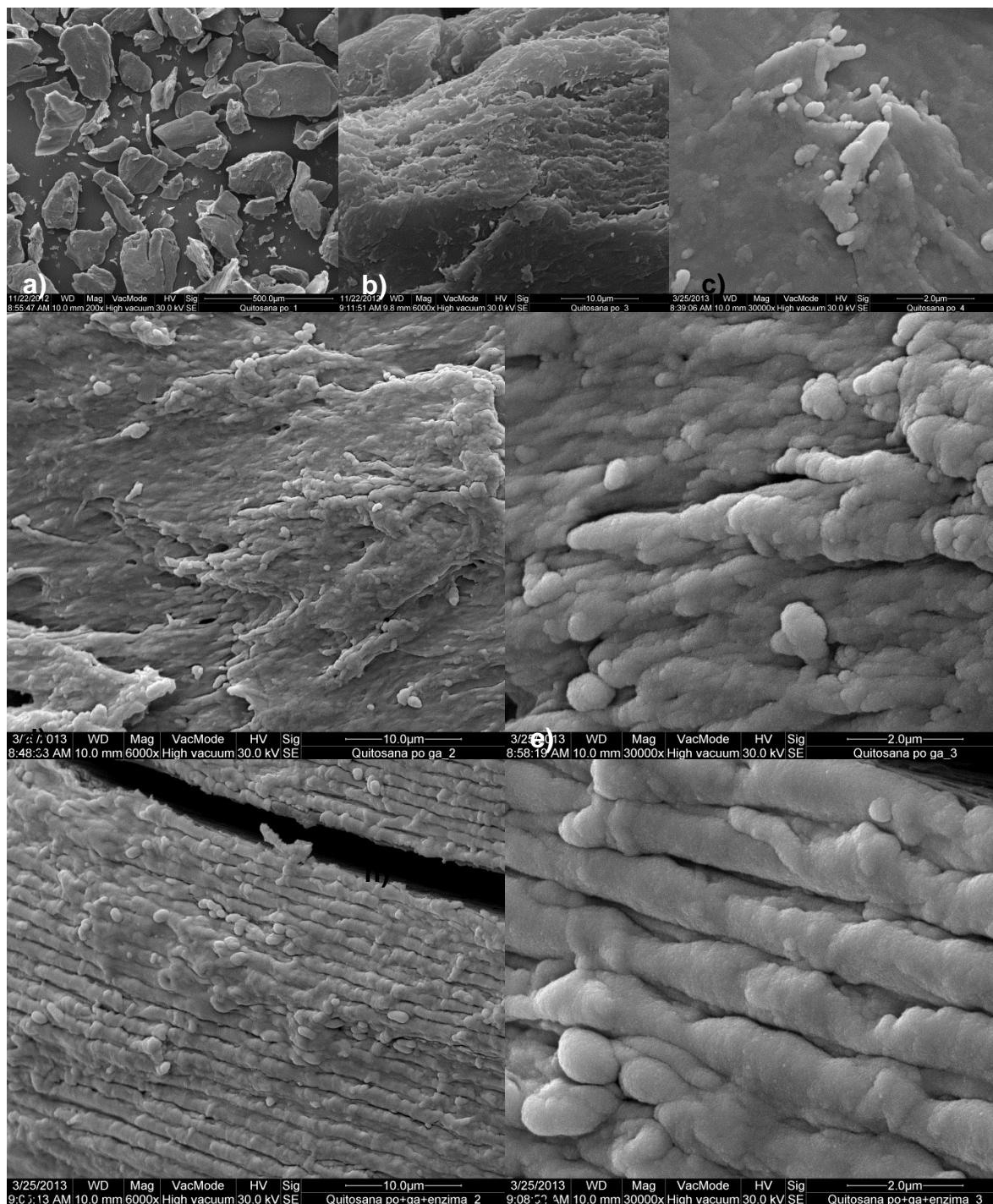


Fonte: próprio autor

¹aumento de 2 x; ²aumento de 10 x; ³aumento de 100 x; ⁴ aumento de 500 x; ⁵aumento de 50 x

A superfície da quitosana em pó foi analisada antes e após a imobilização da lipase (Figura 44). A quitosana natural consiste de um material liso membranoso não muito poroso composto por fendas de forma arredondadas, cristalitos e microfibrilas (KUMAR et al., 2011). Estas descrições podem ser confirmadas na Figura 44a-c, pela observação de uma superfície lisa e plana. Após a ativação com GA, uma superfície rugosa foi obtida (Figura 44d-e) que após ligação cruzada com a enzima, uma superfície com estrias e aglomerados foi obtida (Figura 44f-g).

Figura 44 – Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura da quitosana em pó (a), (b)¹ e (c)² sem ativação (d) e (e)³ ativadas com glutaraldeído e (f) e (g)³ depois da imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01



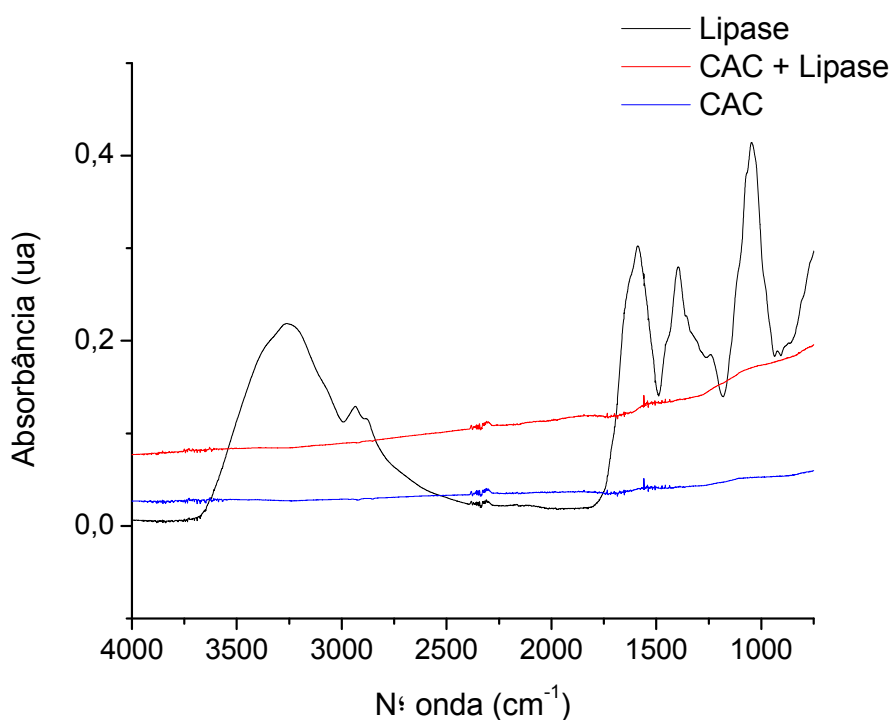
Fonte: próprio autor

¹aumento de 50 x; ²aumento de 250 x; ³aumento de 5 x

5.5.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho

Na Figura 45, os espectros do CAC antes e após a imobilização, assim como o da lipase livre são apresentados. Pode-se notar ausência de estiramentos no espectro deste carvão que foi ativado fisicamente por vapor d'água a altas temperaturas. Essa baixa intensidade é o resultado da ação do ativador $H_2O + N_2$ em altas temperaturas: o oxigênio e os grupos que contêm oxigênio são decompostos e extraídos da superfície (BOUCHELTA et al., 2008). Em alguns casos, aparece a banda de adsorção de água nestes materiais que prejudica o seu uso como adsorvente (REDDY et al., 2012). Devido à interação com a enzima, observa-se aumento na intensidade na região de 1500 cm^{-1} no espectro do CAC.

Figura 45 – Espectros de infravermelho da lipase livre e do suporte Carvão Ativado de Coco antes e após a imobilização

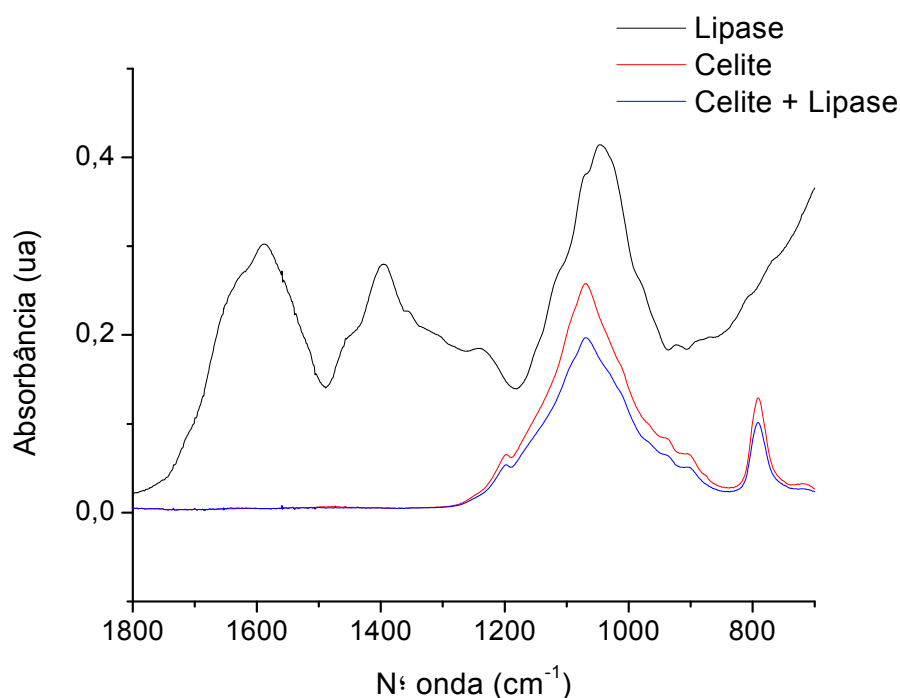


Fonte: próprio autor

A Figura 46 exibe os espectros de infravermelho obtido para o suporte Celite puro, para a lipase livre e para o sistema imobilizado. Para o suporte, o espectro apresenta bandas localizadas em aproximadamente 1070 e 800 cm^{-1} que podem ser atribuídas ao estiramento do grupo siloxano ($-Si-O-Si-$) e a vibração $Si-OH$, respectivamente (POURJAVADI et al., 2010).

A lipase livre apresenta um espectro típico de proteínas com bandas de absorção associadas ao grupo amino (CONH) característico. Nos comprimentos de onda entre $1400-1600\text{ cm}^{-1}$, estão exibidos os grupamentos amino primários e secundários (GOLDBERG; CHAFFOTTE, 2005). Esses picos característicos desapareceram após a imobilização, possivelmente devido a sua fixação no suporte.

Figura 46 – Espectros de infravermelho da lipase livre e do suporte Celite antes e após a imobilização



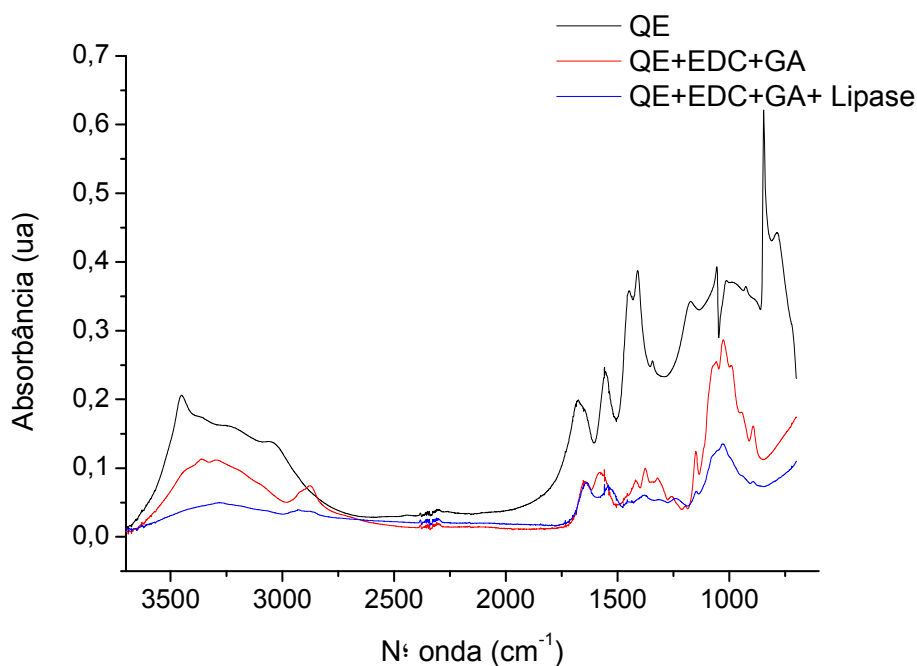
Fonte: próprio autor

Na Figura 47 são apresentados os espectros da quitosana em esferas, sem ativação, após ativação e após a imobilização. É possível observar as bandas características da quitosana pura: presença de hidroxilas (estiramento OH) em aproximadamente 3500 cm^{-1} ; estiramento C-H em aproximadamente 2900 cm^{-1} ; deformação axial de C=O de amida primária em 1630 cm^{-1} ; grupos alquís e carboxilatos (O-C-O) a 1400 cm^{-1} ; deformação angular de N-H de amina primária em 1500 cm^{-1} ; aminas alifáticas em $1070\text{ a }1100\text{ cm}^{-1}$; estiramento C-O de álcool primário em 1020 cm^{-1} (BEPPU et al., 1999; SOUZA et al., 2010).

Entretanto, pela ativação com EDC e GA, a intensidade destes estiramentos diminuiu, denotando que os grupamentos hidroxila e amino da quitosana foram ligados ao glutaraldeído e ao EDC. Nota-se que, com a imobilização, a intensidade destes estiramentos (O-H e N-H) diminuiu ainda mais,

sugerindo a ligação da enzima não só via grupamento amino da quitosana, mas também via grupamento hidroxila.

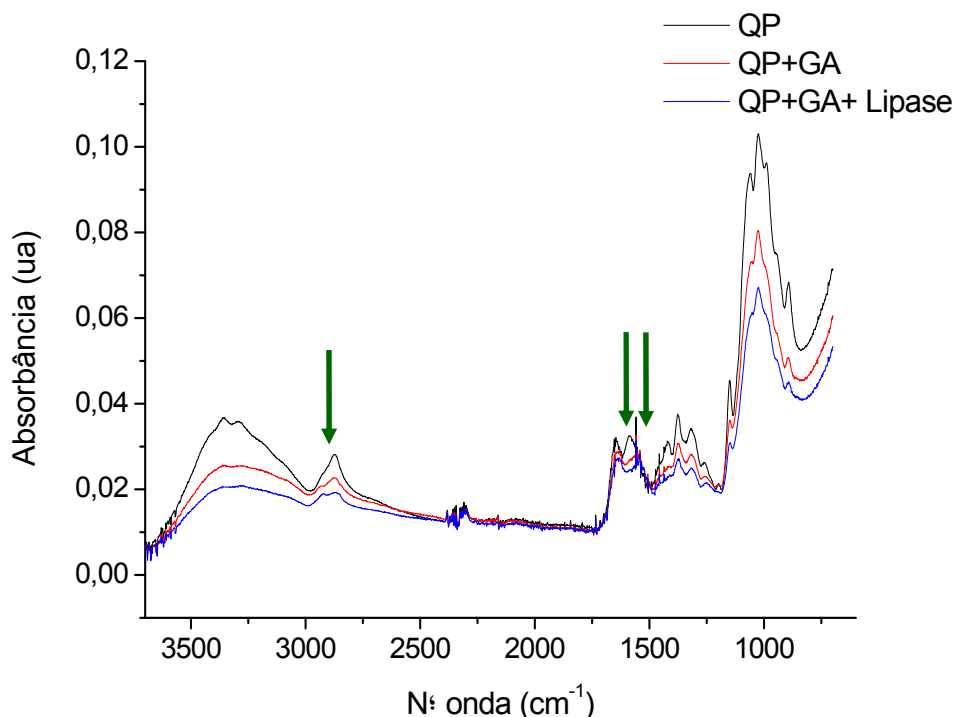
Figura 47 – Espectros de infravermelho do suporte quitosana em esferas modificada com EDC e glutaraldeído antes e após a imobilização



Fonte: próprio autor

A Figura 48 apresenta os espectros de infravermelho da QP modificada com GA antes e após a imobilização. É possível observar que a intensidade da banda relativa à amina alifática em $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$ diminuiu, sugerindo que estes grupos foram ligados aos grupos aldeído do glutaraldeído, formando uma ligação característica, imina ($\text{N}=\text{C}$). O fato pode ser confirmado pelo aparecimento de duas novas bandas no suporte ativado (setas verdes) em aproximadamente 1560 e 1630 cm^{-1} . Estas bandas podem ser atribuídas à ligação $\text{C}=\text{C}$ e à ligação imina ($\text{N}=\text{C}$) (MONTEIRO JUNIOR; ARIOLD, 1999; BEPPU et al., 2007).

Figura 48 – Espectros de infravermelho do suporte quitosana em pó modificada com glutaraldeído antes e após a imobilização



Fonte: próprio autor

5.6 APLICAÇÃO DA LIPASE LIVRE E IMOBILIZADA NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

5.6.1 Produção de Biodiesel com a Lipase Livre

Os testes preliminares de produção de biodiesel foram realizados em balão de fundo chato de três bocas acoplado a um sistema de refluxo com banho termostatizado e agitação magnética. A quantidade de enzima utilizada variou de 64 a 5250 U, a massa de óleo foi de 100 g, a razão molar óleo:etanol destes ensaios foi 1:6,6. A temperatura e a agitação foram de 45 °C e 400 rpm, respectivamente. Os ensaios foram realizados em duplicata.

A presença de ésteres alquílicos nas amostras produzidas foi determinada através de análise de cromatografia de camada delgada (CCD) e espectroscopia de absorção no infravermelho (IV). Um padrão de biodiesel químico fornecido pela empresa BIOPAR foi utilizado para comparação.

A espectroscopia de absorção no infravermelho foi utilizada para identificação de funções e atribuição de bandas características de ésteres, para fins qualitativos do biodiesel padrão (BQ) e também do produto obtido com a lipase livre

de *B. ribis* (BE). Os grupamentos encontrados que são característicos do BQ estão listados na Tabela 29, comparado aos do BE.

Tabela 29 – Caracterização dos constituintes do padrão de biodiesel (BQ) e produto obtido com a lipase livre de *Botryosphaeria ribis* EC-01 (BE) por espectroscopia de absorção no infravermelho

| Amostra | Bandas teóricas* | Bandas experimentais | Descrição da banda |
|---------|------------------------------|-----------------------|--------------------|
| BQ | 1300 – 1000 cm ⁻¹ | 1198 cm ⁻¹ | νC – O |
| | 1820 – 1660 cm ⁻¹ | 1747 cm ⁻¹ | νC = O |
| BE | 1300 – 1000 cm ⁻¹ | 1163 cm ⁻¹ | νC – O |
| | 1820 – 1660 cm ⁻¹ | 1747 cm ⁻¹ | νC = O |

Fonte: próprio autor

*SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000

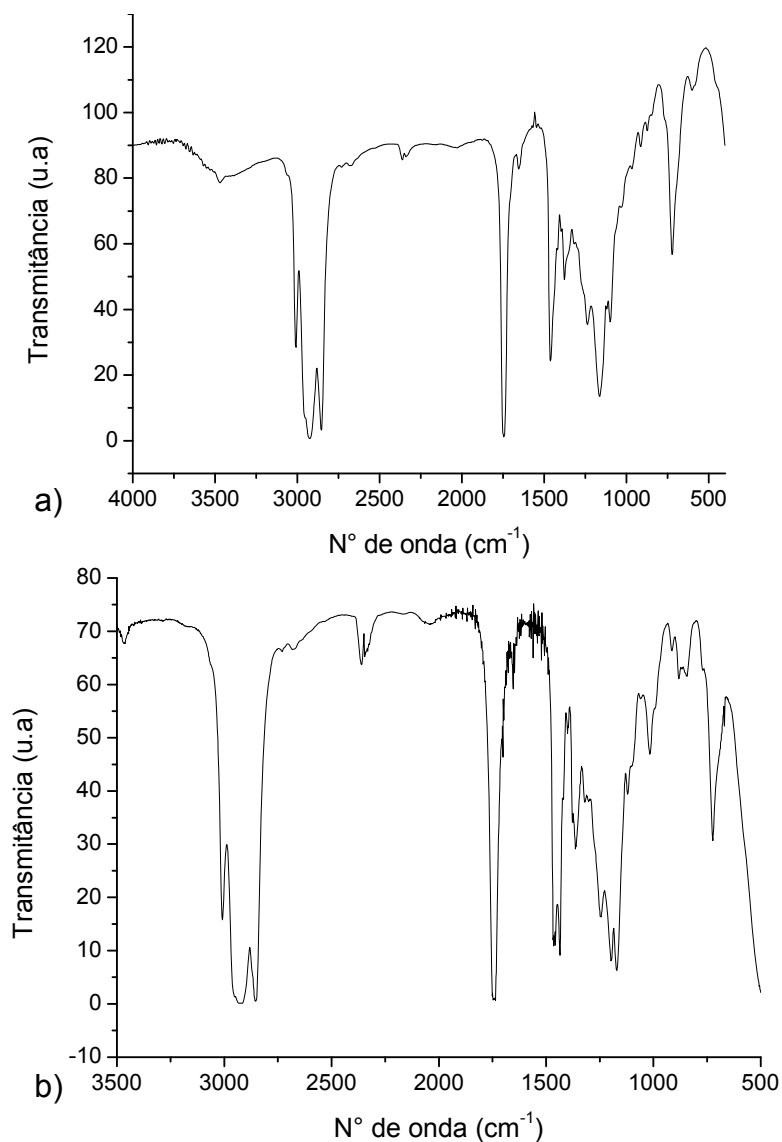
A Figura 49 apresenta os espectros obtidos por espectroscopia de infravermelho para o padrão de biodiesel (BQ) e para o produto obtido com a lipase (BE). É possível observar os estiramentos característicos de biodiesel (Tabela 29). Porém, a presença de uma banda acima de 3000cm⁻¹ foi detectada no BE. Esta banda evidencia a contaminação do produto por proteínas, pois esta banda é característica de amina (acima de 3000cm⁻¹), presente na estrutura de proteínas. Também estão presentes longas cadeias carbônicas que podem ser verificadas pela vibração C-H de alifáticos entre 3000 e 2800 cm⁻¹, e pela deformação C-H em 1515 cm⁻¹ e ~1463 cm⁻¹. A presença de mais de quatro carbonos sp² conjugados é indicada pela banda correspondente ao movimento torsão ordenado das ligações C-H em movimento sincronizados entre 750-700 cm⁻¹ (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Foi desenvolvida uma técnica de lavagem a quente (80°C) associada à secagem do biodiesel em chapa de aquecimento na temperatura de 100°C, que proporcionou a remoção da proteína. Os testes foram acompanhados por espectroscopia de absorção no infravermelho, onde se verificou ausência da contaminação por proteína no produto final pela ausência da banda de amina (acima de 3000cm⁻¹).

Na literatura não se encontram muitos estudos que utilizam a enzima livre no processo de transesterificação para produção de biodiesel (CHEN; DU; LIU, 2008; KROUMOV et al., 2007); isto porque utilizar a enzima na sua forma livre apresenta dificuldades técnicas como a contaminação do produto com proteínas e não ser economicamente viável (AL-ZUHAIR, 2007). As enzimas são amplamente

utilizadas na sua forma imobilizada (SHA; GUPTA, 2007; ROYON et al., 2007; MODI et al., 2007; NOUREDDINI et al., 2005; YANG et al., 2005) que, além de permitirem a sua reutilização por várias vezes, reduz o custo da produção, melhoram a qualidade do produto.

Figura 49 – Espectros de infravermelho do (a) padrão de biodiesel e (b) produto obtido com a catálise enzimática



Fonte: próprio autor

Os produtos provenientes da transesterificação enzimática do óleo de soja dos ensaios que comprovaram presença de ésteres etílicos por CCD e IV foram submetidos à análise de cromatografia gasosa (CG). Os resultados obtidos evidenciaram que apenas 0,25% em massa do produto era composto por ésteres de

biodiesel. A Agência Nacional do Petróleo (ANP) considera biodiesel o produto com no mínimo 96,5% em massa de ésteres.

Com o intuito de aumentar a produção de ésteres, a transesterificação do óleo de soja em diferentes condições de temperatura, razão de óleo/álcool e agitação foi investigada, usando a lipase livre de *B. ribis* EC-01. As reações foram desenvolvidas em sistemas de refluxo igual ao mostrado na Figura 15 (parte experimental). Desta forma, 4 sistemas: A (50°C/1:9), B (50°C/1:18), C (45°C/1:9) e D (45°C/1:18) foram investigados. A quantidade de enzima e óleo foi de 200 U e 100 g, respectivamente, para todos os sistemas e o álcool usado foi o etanol. Alíquotas foram retiradas (5 mL) em tempos específicos (7, 24, 48, 72 e 96 h) e avaliadas por CG e CCD. A lipase de *B. ribis* EC-01 mais uma vez foi capaz de catalisar a transesterificação. O máximo de conversão de ésteres etílicos alcançado foi de 3,67% em 7h de reação, com o sistema D (óleo de soja/etanol = 1:18 a 45°C, agitação magnética). Análises de GC evidenciaram que a formação do produto não aumentou após 7h de reação neste sistema, mantendo-se constante por 96h.

O sistema de agitação orbital (200 rpm) também foi testado para a lipase livre de *B. ribis* EC-01 e neste caso utilizando uma escala reduzida (5 g de óleo), metanol como álcool (1:5), 300 U de enzima a 50 °C durante 48 h. O máximo de conversão em ésteres obtido foi de 6%. Esses baixos valores para a produção podem ser devido a quantidade de enzima utilizada, além de fatores que podem influenciar na desativação desta enzima como quantidade de água no sistema, álcool em excesso não reagido e agitação.

Alguns estudos empregam a forma livre de lipase como referência e estudo cinético das reações (AL-ZUHAIR, 2008; AL-ZUHAIR et al., 2009; CABALLERO et al., 2009). Entretanto, o uso de lipases imobilizadas na produção de biodiesel é importante por razões técnicas de aplicação devido à sua recuperação do meio reacional e reuso contínuo (XIE; MA, 2009; ZENG et al., 2009).

5.6.2 Produção de Biodiesel com a Lipase Imobilizada de *Botryosphaeria ribis* EC-01

A produção de biodiesel utilizando a lipase imobilizada de *B. ribis* EC-01 foi desenvolvida em agitador orbital em frascos de 50 mL para os sistemas

CAC, Celite, QE ativada com EDC e GA e QP ativada com 0,25 % (v/v) de GA. Os resultados foram analisados por CCD, IV e CG.

5.6.2.1 Lipase imobilizada em carvão ativado de coco

A reação de transesterificação do óleo de soja utilizando a lipase imobilizada em CAC foi analisada qualitativamente por CCD. Através desta análise foi possível verificar manchas características de ésteres metílicos e etílicos, utilizando o metanol e o etanol na razão óleo: álcool de 1:6,6. Entretanto, quando analisados por CG os produtos gerados apresentaram somente traços de ésteres.

5.6.2.2 Lipase imobilizada em quitosana em esferas e em pó

O processo de transesterificação utilizando a lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em quitosana em esferas (QE) e em pó (QP) foi desenvolvido segundo um planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central, durante 96 h a 45 °C e os resultados de rendimentos obtidos por CG estão na Tabela 30.

Tabela 30 – Planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central para a produção de biodiesel utilizando a lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em quitosana em esferas (QE) e quitosana em pó (QP)

| Experimentos | X_1 metanol | X_2 água | X_3 t-butanol | % Conversão | |
|-------------------------|---------------|------------|-----------------|-------------|-------|
| | | | | QE | QP |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 8,83 | 10,15 |
| 2 | -1 | -1 | 1 | 2,97 | 3,96 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | 5,13 | 6,89 |
| 4 | -1 | 1 | 1 | 5,68 | 6,28 |
| 5 | 1 | -1 | -1 | 4,52 | 5,32 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | 4,75 | 4,83 |
| 7 | 1 | 1 | -1 | 4,83 | 6,06 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 6,34 | 6,56 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 4,43 | 7,17 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 4,40 | 7,10 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 4,39 | 7,14 |
| Variáveis | | -1 | 0 | +1 | |
| X_1 metanol (mmol) | | 28,3 | 33,9 | 39,5 | |
| X_2 água (% m/v) | | 0,5 | 2,5 | 4,5 | |
| X_3 t-butanol (% m/v) | | 8 | 10 | 12 | |

Fonte: próprio autor

A máxima conversão em ésteres alcançada por esses sistemas foi quando os fatores metanol (X_1), água (X_2) e *t*-butanol (X_3) estavam no nível inferior, ou seja, 28,3 mmol (razão 1:5), 0,5 % e 8 %, respectivamente.

A estimativa dos efeitos para o rendimento de ésteres utilizando a lipase imobilizada em QE e QP é apresentada na Tabela 32 e 33, respectivamente. Os valores absolutos de t_{calc} (efeitos padronizados) fornecem as alturas das barras horizontais nos diagramas de Pareto (Figuras 50 e 51). O valor de $t_{Tab} = 2,13$ (em nível de 10% de significância e 4 graus da liberdade da variável aleatória t) completa esses diagramas gerados e fornece o valor a partir do qual os efeitos são significativos (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Como pode ser observado para o sistema composto pela enzima imobilizada em QE (Tabela 31), as interações metanol (mmol) x *t*-butanol (% m/v) ($X_1 \times X_3$) e água (% m/v) x *t*-butanol (% m/v) ($X_2 \times X_3$) foram significativas e influenciaram positivamente o rendimento de conversão em ésteres (Figura 50).

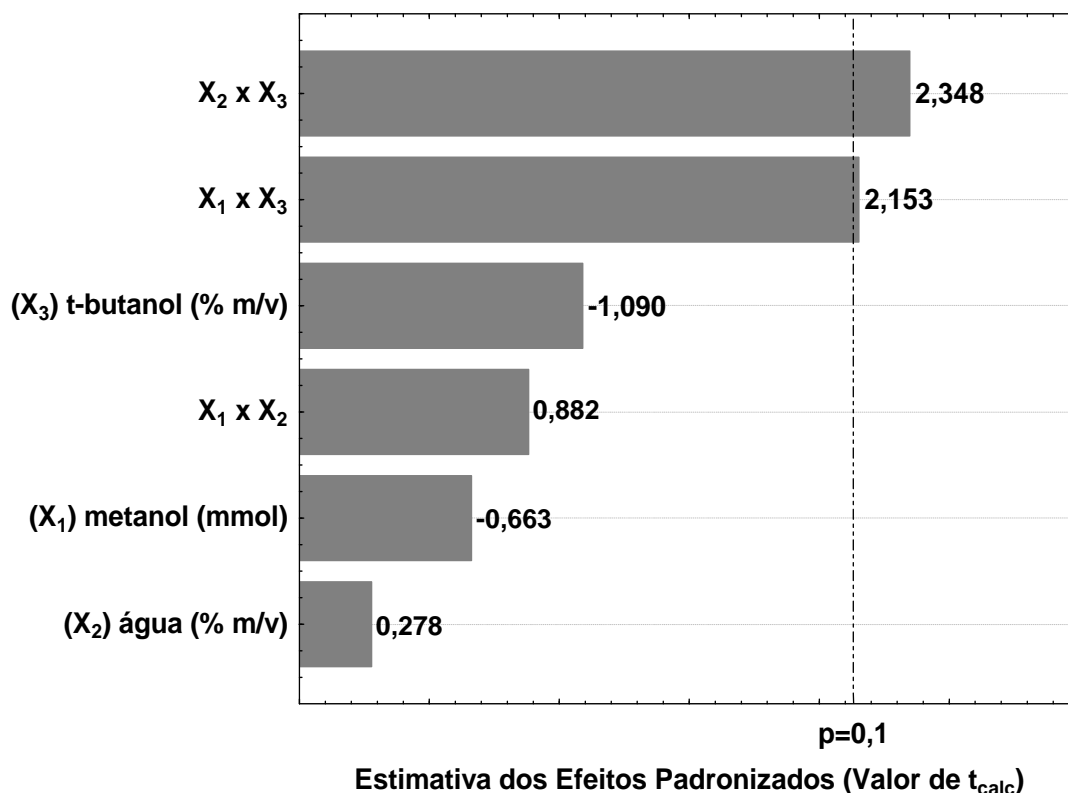
Tabela 31– Estimativa dos efeitos para o rendimento em éster (%) utilizando a lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em esferas de quitosana

| Fatores | Efeito (%) | Erro Padrão | T_{calc} (4) | p-valor | Estimativa por intervalo (90%) | |
|---------------------------------|--------------|--------------|----------------|--------------|--------------------------------|-----------------|
| | | | | | Limite Inferior | Limite Superior |
| Média | 5,115 | 0,349 | 14,653 | 0,000 | 4,371 | 5,860 |
| X_1 metanol (mmol) | -0,543 | 0,819 | -0,663 | 0,544 | -2,288 | 1,203 |
| X_2 água (% m/v) | 0,228 | 0,819 | 0,278 | 0,795 | -1,518 | 1,973 |
| X_3 <i>t</i> -butanol (% m/v) | -0,893 | 0,819 | -1,090 | 0,337 | -2,638 | 0,853 |
| $X_1 \times X_2$ | 0,723 | 0,819 | 0,882 | 0,427 | -1,023 | 2,468 |
| $X_1 \times X_3$ | 1,763 | 0,819 | 2,153 | 0,098 | 0,017 | 3,508 |
| $X_2 \times X_3$ | 1,923 | 0,819 | 2,348 | 0,079 | 0,177 | 3,668 |

Fonte: próprio autor

$R^2 = 0,76$; $t_{Tab} = t_{(4;10\%/2)} = 2,13$

Figura 50 – Efeito das variáveis independentes e de suas interações no rendimento em éster (%) utilizando a lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em quitosana em esferas representado no diagrama de Pareto



Fonte: próprio autor

Esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído foram utilizadas na imobilização da lipase de pâncreas de porco. Esse sistema foi utilizado na transesterificação do óleo de salicórnea em presença de hexano e metanol e 55 % de conversão foram alcançados (DESAI et al., 2006).

De acordo com a Tabela 32, observa-se que o efeito das interações metanol (mmol) x *t*-butanol (% m/v) ($X_1 \times X_3$) e água (% m/v) x *t*-butanol (% m/v) ($X_2 \times X_3$) também afetaram de forma positiva o rendimento em éster no sistema composto pela lipase imobilizada em pó de quitosana, todavia, o efeito da variável *t*-butanol (% m/v) foi negativo ($p \leq 0,1$) (Figura 51).

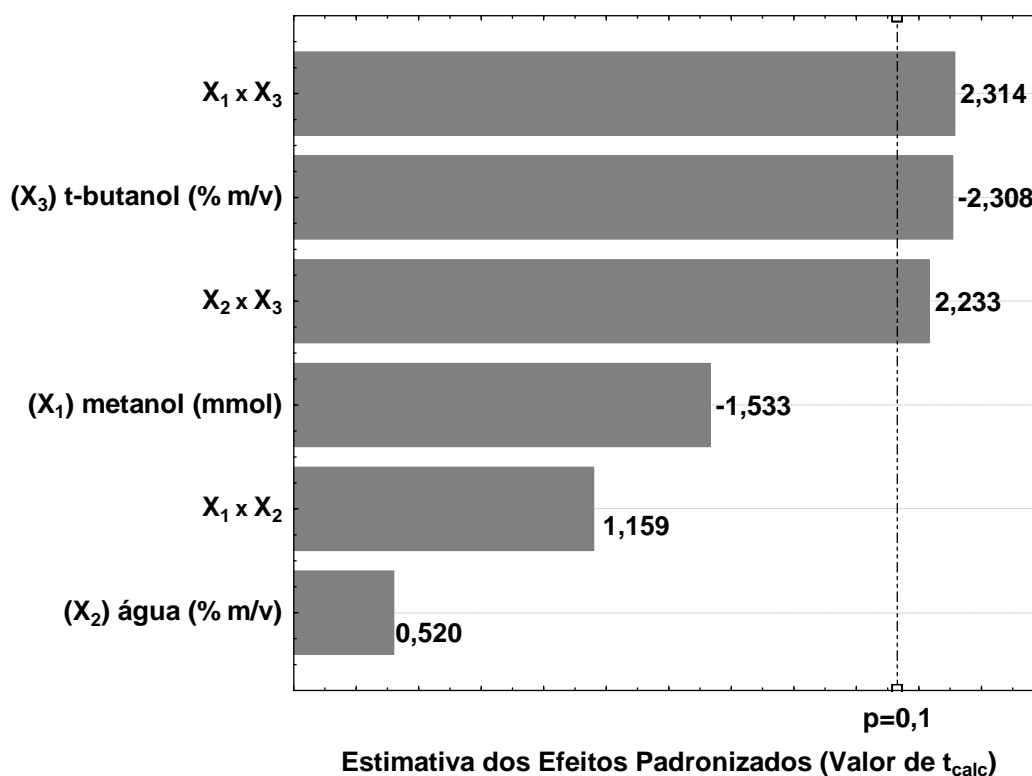
Shao et al. (2008) utilizaram quitosana em pó para imobilizar a lipase de *Candida rugosa* para produção de biodiesel. A enzima imobilizada em quitosana funcionalizada com 0,0025 % (v/v) de glutaraldeído resultou em 63,6 % de conversão utilizando borra de óleo de colza. A condição otimizada para a reação foi: razão metanol/óleo de 4:1, 8 % de enzima, 6 % de água e temperatura de 45 °C.

Tabela 32– Estimativa dos efeitos para o rendimento em éster (%) utilizando lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em quitosana em pó

| Fatores | Efeito (%) | Erro Padrão | T _{calc} (4) | p-valor | Estimativa por intervalo (90%) | |
|----------------------------------|---------------|--------------|-----------------------|--------------|--------------------------------|-----------------|
| | | | | | Limite Inferior | Limite superior |
| Média | 6,496 | 0,314 | 20,715 | 0,000 | 5,827 | 7,164 |
| X ₁ metanol (mmol) | -1,127 | 0,735 | -1,533 | 0,200 | -2,695 | 0,440 |
| X ₂ água (% m/v) | 0,383 | 0,735 | 0,520 | 0,630 | -1,185 | 1,950 |
| X ₃ t-butanol (% m/v) | -1,698 | 0,735 | -2,308 | 0,082 | -3,265 | -0,129 |
| X ₁ xX ₂ | 0,853 | 0,735 | 1,159 | 0,311 | -0,715 | 2,420 |
| X ₁ xX ₃ | 1,703 | 0,735 | 2,315 | 0,082 | 0,134 | 3,270 |
| X ₂ xX ₃ | 1,643 | 0,735 | 2,233 | 0,089 | 0,074 | 3,210 |

$R^2 = 0,83$; $t_{Tab} = t_{(4;10\%/2)} = 2,13$

Figura 51 – Efeito das variáveis e de suas interações no rendimento em éster (%) utilizando a lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em quitosana em pó representado no diagrama de Pareto



Fonte: próprio autor

5.6.2.3 Lipase imobilizada em Celite

A reação de transesterificação do óleo de soja utilizando a lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em Celite foi seguida através de planejamento fatorial, durante 96 h a 45 °C. Após a análise por CCD e IV das amostras obtidas nas reações, estas foram analisadas por CG.

A Tabela 33 apresenta os resultados obtidos por CG com o planejamento 2^3 com triplicata no ponto central. A conversão em ésteres variou de 5,5 a 36,3 %, sendo que a máxima foi alcançada quando as concentrações de metanol (X_4), água (X_5) e *t*-butanol (X_6) estavam no nível inferior, ou seja, 16,9 mmol (razão 1:3), 2,5 % e 10 %, respectivamente.

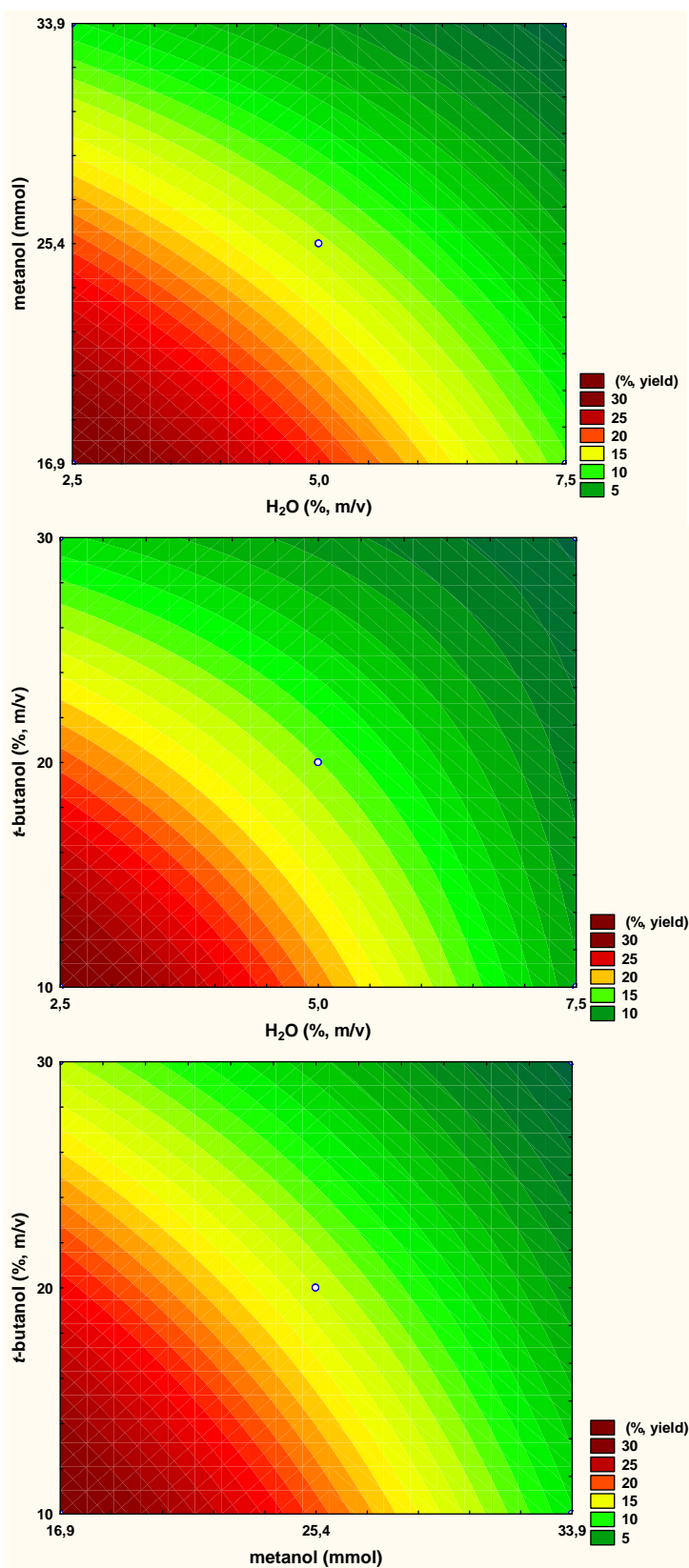
Tabela 33 – Planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central para a produção de biodiesel utilizando a lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em Celite

| Experimentos | X_1 metanol | X_2 água | X_3 <i>t</i> -butanol | % Conversão |
|---------------------------------|---------------|------------|-------------------------|-------------|
| 1 | -1 | -1 | -1 | 36,3 |
| 2 | -1 | -1 | 1 | 9,98 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | 7,98 |
| 4 | -1 | 1 | 1 | 12,1 |
| 5 | 1 | -1 | -1 | 5,87 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | 5,75 |
| 7 | 1 | 1 | -1 | 5,49 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 5,53 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 5,57 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 5,55 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 5,56 |
| Variáveis | | -1 | 0 | +1 |
| X_4 metanol (mmol) | | 16,9 | 25,4 | 33,9 |
| X_5 água (% m/v) | | 2,5 | 5,0 | 7,5 |
| X_6 <i>t</i> -butanol (% m/v) | | 10 | 20 | 30 |

Fonte: próprio autor

Os diagramas de contorno gerados a partir do ajuste do modelo estão apresentados na Figura 52 e indicam a influência das variáveis, metanol, água e *t*-butanol na produção de ésteres pela lipase imobilizada em celite.

Figura 52 – Diagramas de contorno gerados no planejamento fatorial 2^3 para a produção de ésteres utilizando a lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em Celite



Fonte: próprio autor

Todavia, neste modelo linear, somente a variável metanol (X_4 , em negrito) foi a mais importante (Equação 13), ou seja, significativa no nível de 90% ($p \leq 0,10$, $R^2 = 0,78$).

$$\text{Rendimento (\%)} = 9,6 - 5,5X_4 - 3,4X_5 - 2,8X_6 + 3,2X_4X_5 + 2,8X_4X_6 + 3,8X_5X_6 \quad (13)$$

A análise de variância do modelo linear está apresentada na Tabela 34 e exibe que $F_{\text{calc}} > F_{\text{list}}$ nos graus de liberdade correspondente de conversão em ésteres pela lipase imobilizada em Celite. O valor F comprova que existe significância do modelo, apesar do R^2 ser de 0,78, sugerindo um direcionamento confiável para novos experimentos.

Tabela 34 – Análise de variância (ANOVA) para o planejamento factorial 2^3 para a produção de ésteres utilizando a lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em Celite.

| Fonte de variação | Soma Quadrados (SS) | Graus de Liberdade (DF) | Média Quadrados (MS) | F teste | |
|-------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|
| | | | | F_{calc} | F_{list} |
| Modelo | 651,06 | 2 | 325,5 | 16,11 | 3,01 ^b |
| Resíduo | 181,86 | 9 | 20,21 | | |
| Total | 832,92 | 10 | | | |

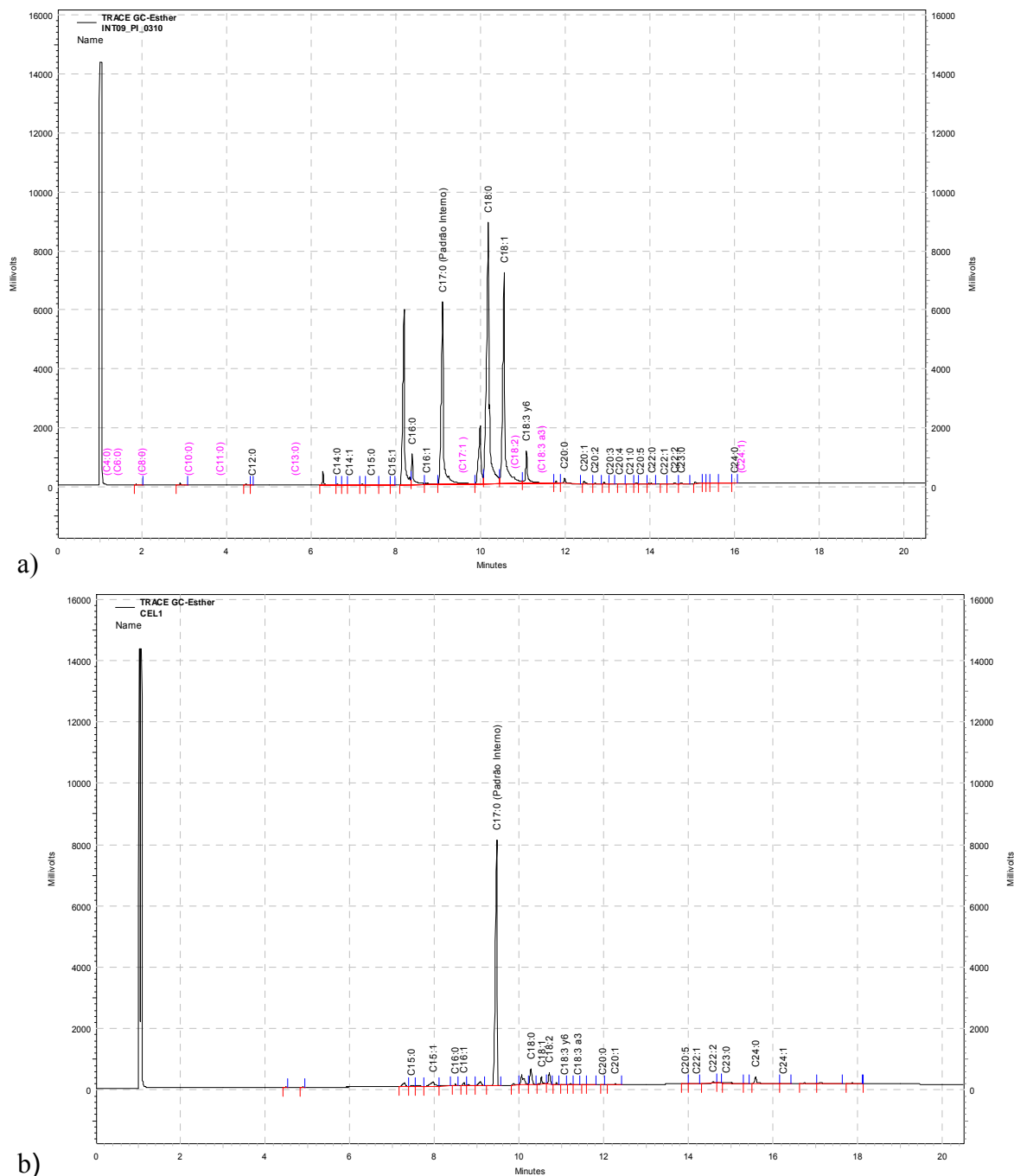
Fonte: próprio autor
 $R^2 = 0,78$; $F_{90\%} = 2,9$

A metodologia de superfície de resposta também foi utilizada por Liu et al. (2007) para a metanólise do óleo de soja para a produção de biodiesel em presença de *t*-butanol. Nas condições otimizadas de *t*-butanol/óleo (1,6), metanol/óleo (5,2), quantidade de água (3,1 %) e enzima (12 %) obtiveram 72 % de rendimento.

A Figura 53 e 54 a seguir exemplificam cromatogramas e espectros de absorção no infravermelho obtido para o padrão de biodiesel (catálise química), comparados aos produtos obtidos com a catálise enzimática, com a enzima imobilizada em Celite.

Pelas análises de CG foi possível observar que o produto obtido com a lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada possui os picos característicos de biodiesel, mas em menor concentração, se comparado ao padrão (Figura 53).

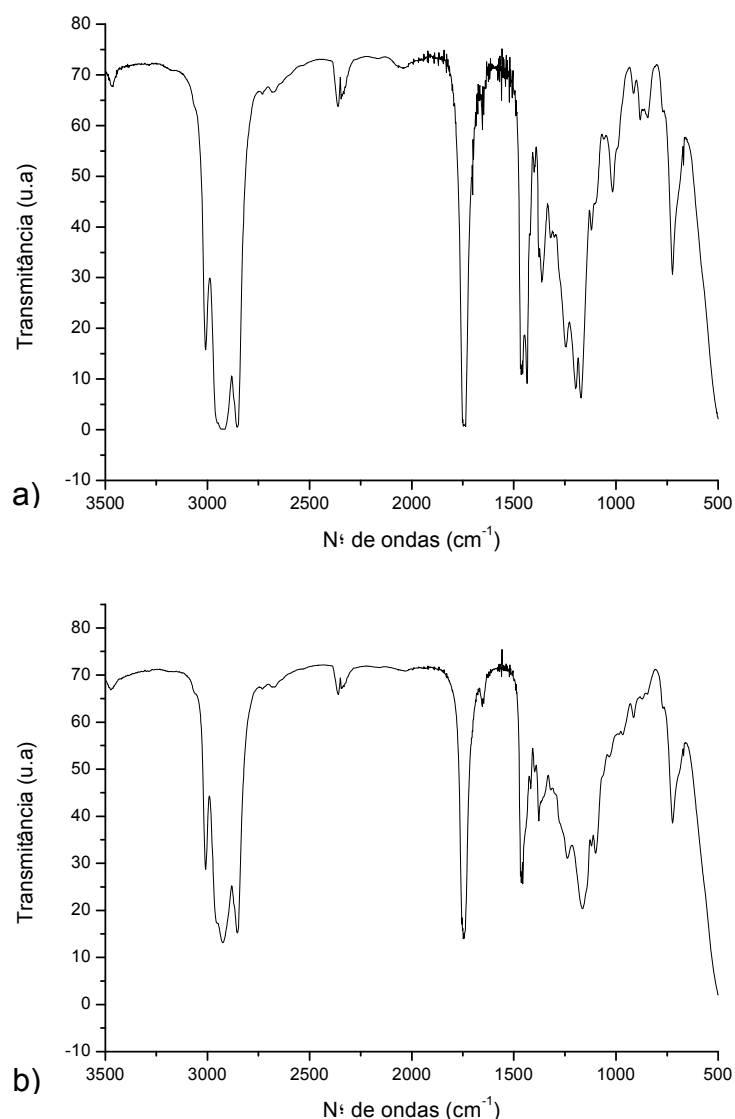
Figura 53— Cromatograma obtido com o (a) padrão de biodiesel e (b) produto da catálise enzimática utilizando a lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em Celite



Fonte:próprio autor

Pelos espectros de IV foi possível observar os estiramentos característicos de ésteres com o produto obtido com a lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em Celite, comparado ao biodiesel padrão (Figura 54).

Figura 54 – Espectro de infravermelho obtidos com (a) padrão de biodiesel e (b) produto obtido com a lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em Celite



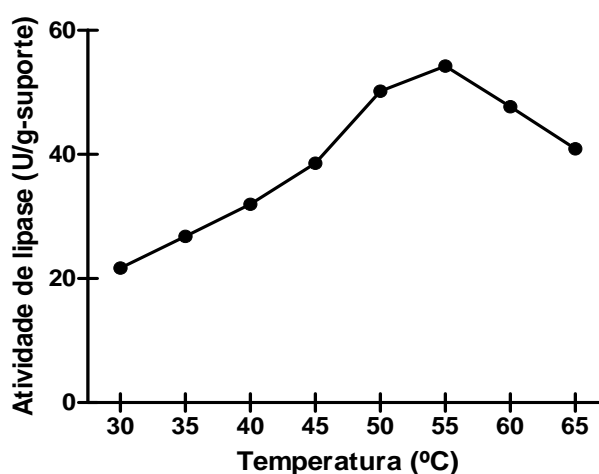
Fonte: próprio autor

5.7 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CINÉTICOS DA LIPASE IMOBILIZADA EM CELITE

A lipase de *Bribis* EC-01 imobilizada em Celite foi estudada quanto a alguns parâmetros físico-químicos e cinéticos.

Como pode ser observado nas Figuras 55 e 56, a lipase imobilizada em Celite manteve seu ótimo de atividade a 55 °C e em tampão fosfato pH 8, assim como determinado para esta enzima livre.

Figura 55– Efeito da temperatura na atividade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em Celite. A atividade foi determinada na condição padrão descrita no item 4.2.4.

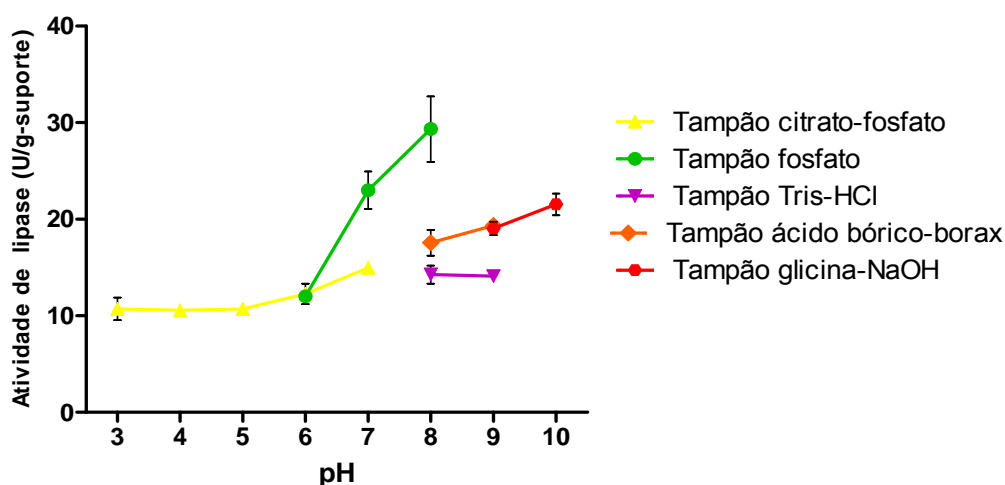


Fonte: próprio autor

A maioria das lipases imobilizadas apresentam valores de temperatura ótima maiores do que de suas formas livres, que se deve ao fato de que as enzimas imobilizadas são menos sensíveis à desativação térmica desde que sua estrutura é mais rígida após a imobilização (VILLENEUVE et al., 2000). Isso também pode significar que o procedimento de imobilização utilizado não afetou a energia de ativação da lipase, tendo assim a mesma temperatura ótima para a atividade lipolítica (LIU et al., 2009). Resultados semelhantes foram descritos por Liu et al. (2009), com uma lipase de *Burkholderia sp* covalentemente imobilizada em Celite; para a enzima livre e imobilizada obtiveram uma temperatura ótima de 55 °C.

Com algumas exceções, o pH ótimo para as lipases imobilizadas são iguais ou superiores àqueles apresentados para a sua forma livre (MALCATA, 1992). Assim como a lipase de *B. ribis* EC-01, mesmo pH para a forma livre e imobilizada foi reportado por Silva et al. (2008) para a lipase de *Aspergillus niger* imobilizada em Celite por adsorção. Ambas as lipases apresentaram máxima atividade em pH 6. Entretanto, para a lipase de *Burkholderia sp* covalentemente imobilizada em Celite houve incremento em seu pH, passando de 9 para 10. Os autores atribuíram a mudanças no micro-ambiente da enzima após a imobilização pela reação dos átomos de silício, presente no Celite, com moléculas de H₂O, formando grupos silanol (LIU et al., 2009).

Figura 56 – Efeito do pH na atividade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em Celite. A atividade foi determinada em pH 8 na condição padrão descrita no item 4.2.4



Fonte: próprio autor

Além disso, a lipase imobilizada de *B. ribis* EC-01 mostrou maior atividade acima de 55 °C, quando comparado com sua forma livre. As atividades relativas para a lipase imobilizada em 60 e 65 °C foram de 88 e 75%, respectivamente, enquanto que para a lipase livre foram 64 e 53%, respectivamente, para estas temperaturas.

A Tabela 35 apresenta os resultados de K_M aparente e $V_{m\acute{a}x}$ obtidos para a lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em Celite.

Tabela 35 – K_m aparente e $V_{m\acute{a}x}$ da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em Celite

| Substratos ^a | K_m aparente ^b (mM) | $V_{m\acute{a}x}$ U/g suporte | $V_{m\acute{a}x}$ (μ mol/min mg) |
|---|-------------------------------------|----------------------------------|--|
| acetato de <i>p</i> -nitrofenila (C:2) ^c | 3,61 \pm 0,71 | 8,15 \pm 0,61 | 2,30 \pm 0,17 |
| butirato de <i>p</i> -nitrofenila (C:4) | 3,64 \pm 0,49 | 36,8 \pm 1,87 | 10,4 \pm 0,53 |
| caproato de <i>p</i> -nitrofenila (C:6) | 3,42 \pm 0,99 | 1,90 \pm 0,20 | 0,540 \pm 0,06 |
| caprato de <i>p</i> -nitrofenila (C:10) | 2,16 \pm 0,31 | 13,2 \pm 0,59 | 3,72 \pm 0,17 |
| palmitato de <i>p</i> -nitrofenila (C:16) | 1,86 \pm 0,40 | 50,6 \pm 3,18 | 14,3 \pm 0,90 |
| estearato de <i>p</i> -nitrofenila (C:18) | 2,89 \pm 0,41 | 18,4 \pm 0,90 | 5,19 \pm 0,25 |

Fonte: próprio autor

^a Em solução aquosa;

^b Os ésteres de *p*-nitrofenila foram testados como substratos de acordo com a Seção 4.2.4 com variação da concentração de 0,1 a 12 mM;

^c Cadeia carbônica em parênteses.

Semelhantemente à sua forma livre, a enzima imobilizada em Celite hidrolisou todos os substratos e a afinidade aumentou com o aumento da cadeia carbônica até o palmitato de *p*-nitrofenila, exibindo K_{Map} de 1,86 mM. A velocidade

também foi maior para este substrato atingindo o valor de 50,6 U/g-suporte (equivalente a 14,3 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$).

Esta lipase na sua forma livre exibiu $K_{M\text{ap}}$ e $V_{\text{máx}}$, respectivamente, de 0,372 mM e 107 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ (correspondendo a 24,3 U/mL). O aumento do valor de K_M sugere mudanças estruturais na enzima durante a imobilização ou pode ser devido a menor acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima imobilizada. A obstrução de interação enzima-substrato pode ser devido ao efeito de partição entre o suporte e o substrato (KANWAR; GOSWAMI, 2002; CHIOU; WU, 2004).

O incremento no valor de K_M em relação à enzima livre também foi reportado por Tutar et al. (2009) para a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em um polímero natural chamado esporopolenina. A lipase livre exibiu K_M de 1,06 mM, enquanto que para a imobilizada foi de 7,54 mM.

A Tabela 36 faz uma comparação entre as constantes de desativação e tempo de meia vida da lipase livre de *B. ribis* EC-01 e imobilizada em Celite em temperaturas de 40 a 55 °C durante 96 h. Os plots dos resultados se encontram na Figura 57.

A constante de desativação térmica foi calculada utilizando a seguinte fórmula;

$$\ln A = \ln A_0 - k_d \times t \quad (14)$$

Em que:

A = atividade residual após um certo período t (h) de incubação;

A_0 = atividade inicial;

k_d = constante de desativação térmica

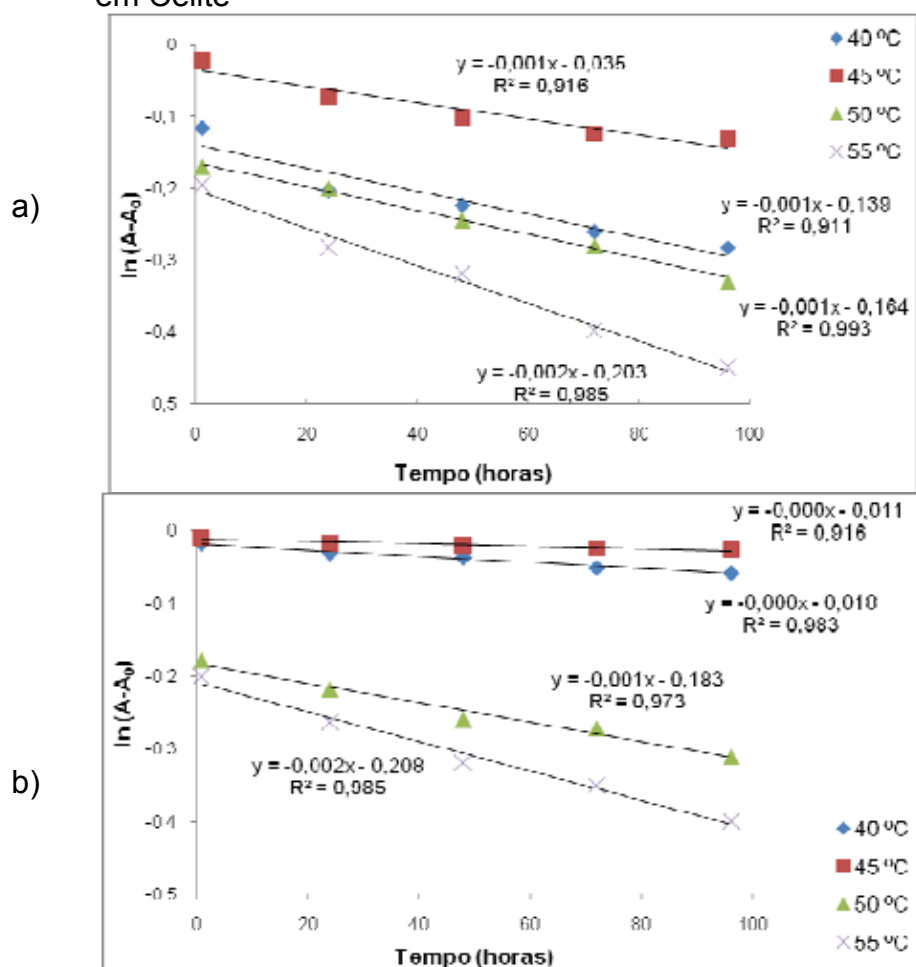
O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) foi calculado pela fórmula:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (15)$$

O conhecimento de dados cinéticos como a desativação térmica e tempo de meia vida de uma enzima é de fundamental importância em processos

biotecnológicos. A maior parte dos estudos sobre cinética enzimática se dedica a dados de velocidade inicial da enzima. Entretanto, em muitas aplicações a viabilidade econômica do processo pode depender do tempo de vida útil da enzima, especialmente quando se considera a sua utilização a longo prazo em reatores contínuos (MURTY et al., 2002).

Figura 57 – Curvas de determinação da constante de desativação térmica (k_d) em diferentes temperaturas para a) enzima livre e b) enzima imobilizada em Celite



Fonte: próprio autor

Como é possível observar a lipase livre de *B. ribis* EC-01 e também sua forma imobilizada apresentou estabilidade térmica em todas as temperaturas testadas, evidenciada por suas constantes de desativação térmica, que variaram de $2,0 \times 10^{-4}$ (lipase imobilizada na temperatura de 45 °C) a $2,6 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ (lipase livre a 55 °C).

Tabela 36 – Comparação entre as constantes de desativação térmica e tempos de meia vida das lipases livre de *Botryosphaeria ribis* EC-01 e imobilizada em Celite em 96 h em temperaturas de 40 a 55 °C

| Temperatura (°C) | $k_d(h^{-1})$ | | $t_{1/2}$ (h) | |
|------------------|----------------------|----------------------|---------------|-------------|
| | Livre | Imobilizada | Livre | Imobilizada |
| 40 | $1,6 \times 10^{-3}$ | $4,0 \times 10^{-4}$ | 433,2 | 1732 |
| 45 | $1,1 \times 10^{-3}$ | $2,0 \times 10^{-4}$ | 630,1 | 3465 |
| 50 | $1,7 \times 10^{-3}$ | $1,3 \times 10^{-3}$ | 407,7 | 533,2 |
| 55 | $2,6 \times 10^{-3}$ | $2,0 \times 10^{-3}$ | 266,6 | 346,6 |

Fonte: próprio autor

A imobilização permitiu o aumento de seu tempo de meia vida tanto em temperatura mais baixa (40 °C) como em 55 °C, em cerca de 300 e 30 %, respectivamente. A lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em Celite teve o seu tempo de meia vida variando de 14 dias (55 °C) a 144 dias (45 °C).

A lipase de *Candida rugosa* imobilizada em bentonita na temperatura de 50 °C obteve tempo de meia vida de 45 minutos, enquanto que em sua forma livre foi de 17 minutos, nesta temperatura (YEŞİLOĞLU, 2005). Já Chen e Lin (2003), para a lipase também de *Candida rugosa* conseguiram aumento no tempo de meia vida (40 °C) de 49,9 para 2740 horas após imobilização por sol-gel. A k_d obtida para a forma livre e imobilizada desta lipase foi de $1,39 \times 10^{-2}$ e $2,53 \times 10^{-4} h^{-1}$, respectivamente). A constante de desativação térmica para a lipase de *B. ribis* EC-01 nesta mesma temperatura foi de $1,6 \times 10^{-3}$ para a enzima livre e de $4,0 \times 10^{-4}$ para a enzima imobilizada.

5.8 PRODUÇÃO DE ELETRODOS MODIFICADOS COM A LIPASE DE *BOTRYOSPHAERIA RIBIS*

Os eletrodos modificados de pasta de carbono foram preparados pela mistura da solução da lipase de *B. ribis* EC-01 e grafite em pó e óleo mineral e então, avaliados frente diversos substratos.

Os biossensores amperométricos necessitam de um mediador para que ocorra a transferência de elétrons do centro ativo da enzima para a superfície do eletrodo (STARODUB, 2006). Neste caso, o mediador foi o próprio eletrodo de pasta de carbono e vários substratos foram testados para avaliar a atividade da lipase nestes sistemas.

O eletrodo de pasta de carbono é muito utilizado, pois é versátil, de baixo custo, compatibilidade com os modificadores e facilidade de renovação da superfície. Uma de suas principais vantagens é que possibilita a modificação interna do material eletrolítico, diferentemente do que ocorre com os eletrodos convencionais, em que a modificação ocorre apenas na superfície (DE OLIVEIRA; VIEIRA, 2006; AHAMMAD et al., 2009). Além disso, permite um contato íntimo entre as enzimas incorporadas, mediador e locais que permitam rápida detecção e transferência de elétrons (SASSOLAS et al., 2012).

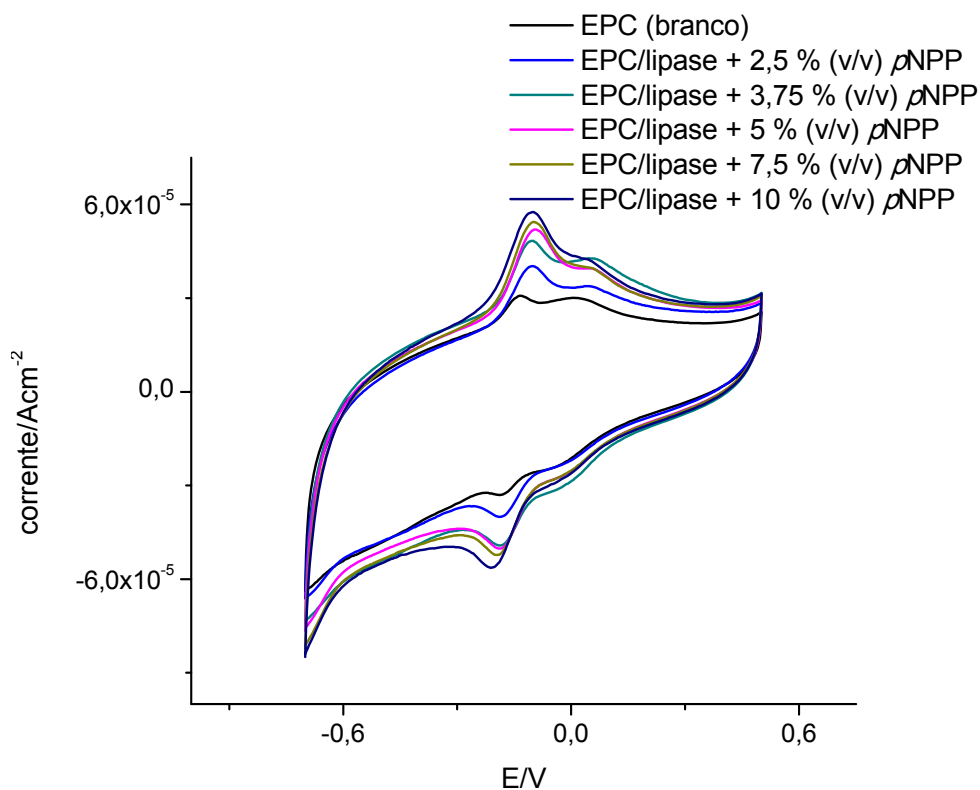
Os bioeletrodos foram investigados em potencial variando de - 0,45 a + 0,5 V e velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. A enzima utilizada tinha atividade de 34 U/mL (atividade específica de 204 U/mg proteína).

Primeiramente, o palmitato de *p*-nitrofenila, amplamente utilizado como substrato para lipases, foi testado utilizando tampão fosfato pH 8 como eletrólito para verificar se a pasta de carbono seria um bom suporte para a enzima. As concentrações 200 (6,8 U ou 0,034 mg/mL proteína) e 400 µL (13,6 U ou 0,067 mg/mL proteína) de lipase também foram avaliadas.

Na Figura 58 pode ser verificada a voltametria cíclica para o eletrodo de pasta de carbono (EPC) modificado com 200 µL da lipase de *B. ribis* EC-01, utilizando como substrato o palmitato de *p*-nitrofenila, que foi adicionado em etapas para verificar a resposta do eletrodo.

Como pode ser verificado, os resultados apresentaram boa resposta da lipase aplicada no eletrodo em concentrações crescentes de *p*NPP. Os resultados mostram que, através de voltametria cíclica a pasta de carbono foi um bom suporte para o mecanismo de transferência de elétrons em sua superfície, visto que a adição de lipase ao eletrodo aumentou a resposta voltamétrica. Para esse sistema o eletrodo mostrou comportamento redox com pico anódico em 0,1 V e catódico - 0,2 V.

Figura 58 – Voltametria cíclica obtida para o eletrodo de pasta de carbono modificado com 200 μL de lipase em concentrações crescentes de palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP). Eletrólito de suporte: tampão fosfato pH 8 $0,05 \text{ molL}^{-1}$ com Triton X-100 (0,4 %, v/v) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

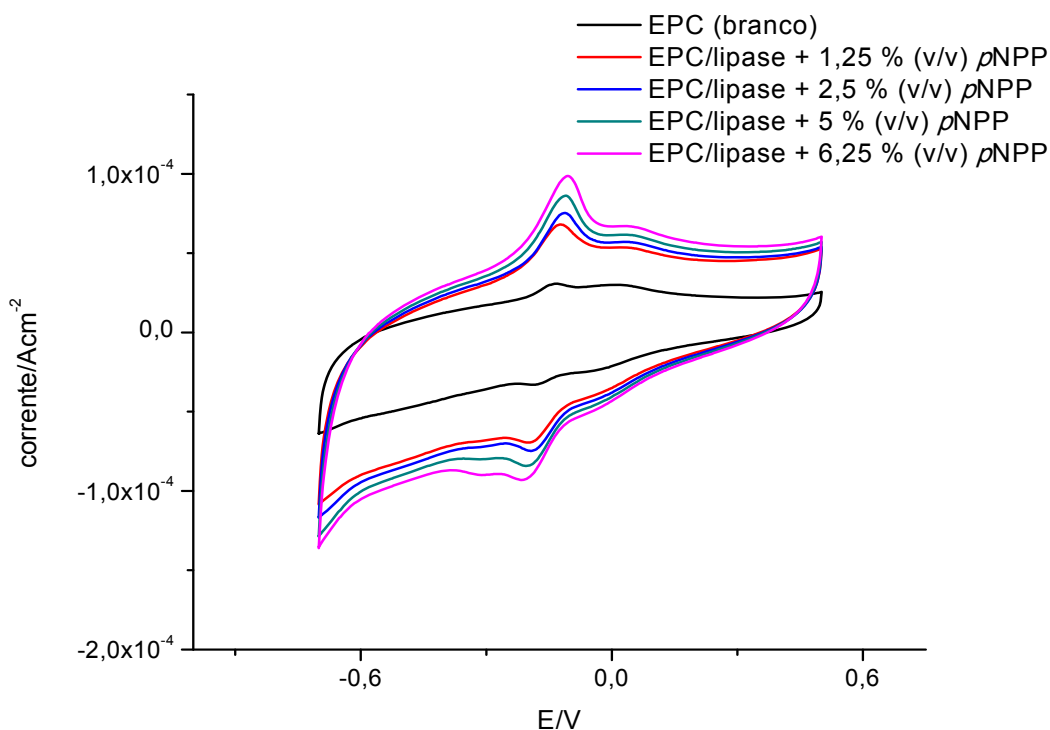


Fonte: próprio autor

O efeito da concentração de lipase adicionada à pasta de carbono foi estudado, pois a velocidade de uma reação catalisada por enzima depende diretamente de sua concentração (FATIBELLO FILHO; CAPELATO, 1991). O estudo do efeito da concentração de lipase mostrou que a resposta aumenta com o aumento da quantidade desta enzima no EPC (Figura 59).

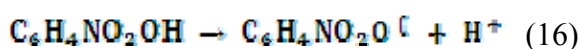
Na Figura 58, considerando a adição de 1 mL de *p*NPP e utilização de 200 μL de lipase, o pico de corrente anódica era em torno de 0,52 μA e com utilização de 400 μL (Figura 59) de lipase houve o incremento do pico (0,86 μA). O pico de corrente catódica passou de -0,50 μA para 0,85 μA , considerando também a adição de 1 mL de *p*NPP. Portanto, nos testes seguintes a quantidade de lipase adicionada ao eletrodo de pasta de carbono foi de 400 μL .

Figura 59 – Voltametria cíclica obtida para o eletrodo de pasta de carbono (EPC) modificado com 400 μL de lipase em concentrações crescentes de palmitato de *p*-nitrofenila. Eletrólito de suporte: tampão fosfato pH 8 $0,05 \text{ molL}^{-1}$ com Triton X-100 (0,4 %, v/v) . $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: próprio autor

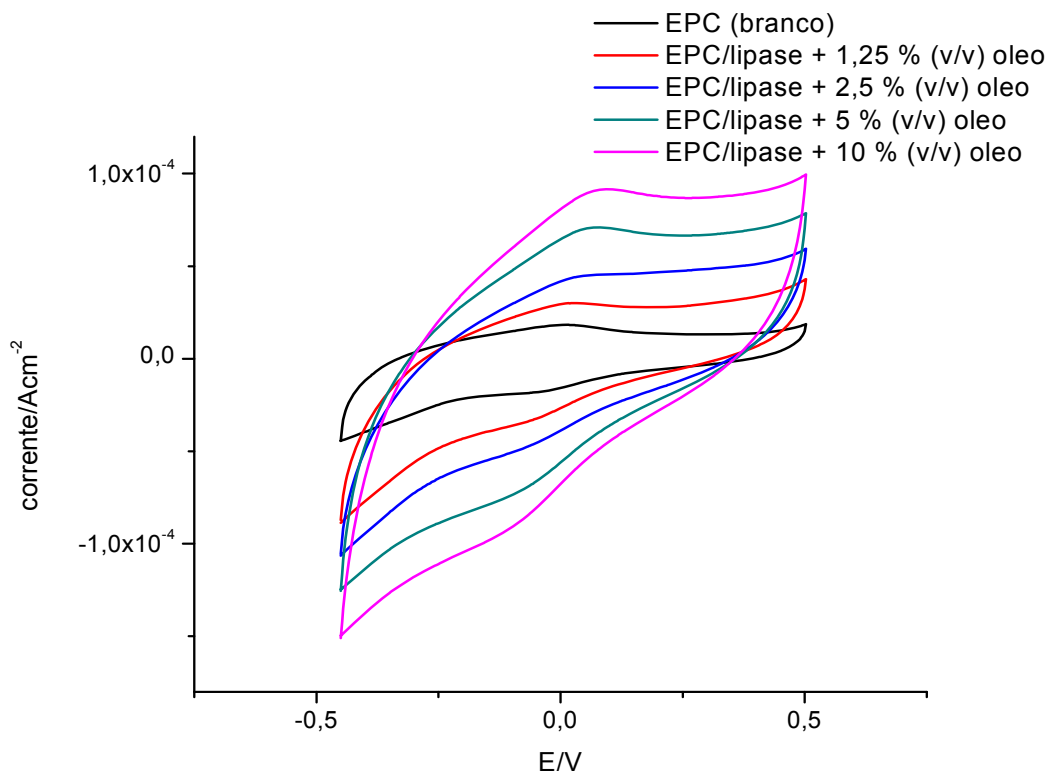
A eletro-oxidação do palmitato de *p*-nitrofenila é mostrada na equação abaixo (REDDY et al., 2012):



Os triacilgliceróis são substratos naturais para as lipases (SHARMA et al., 2001) e são amplamente utilizadas em biossensores para determinação de triacilgliceróis (REJEB et al., 2007; MINAKSHI; PUNDIR, 2008; DHAND et al., 2010; PUNDIR et al., 2010).

Como mostra a Figura 60, o óleo de soja foi testado como substrato para o funcionamento do EPC modificado com 400 μL da lipase de *B. ribis* EC-01. Para este sistema a resposta foi sensível à quantidade de óleo de soja adicionada, sugerindo que a pasta de carbono foi eficaz como suporte para a lipase de *B. ribis* EC-01, funcionando como mediador.

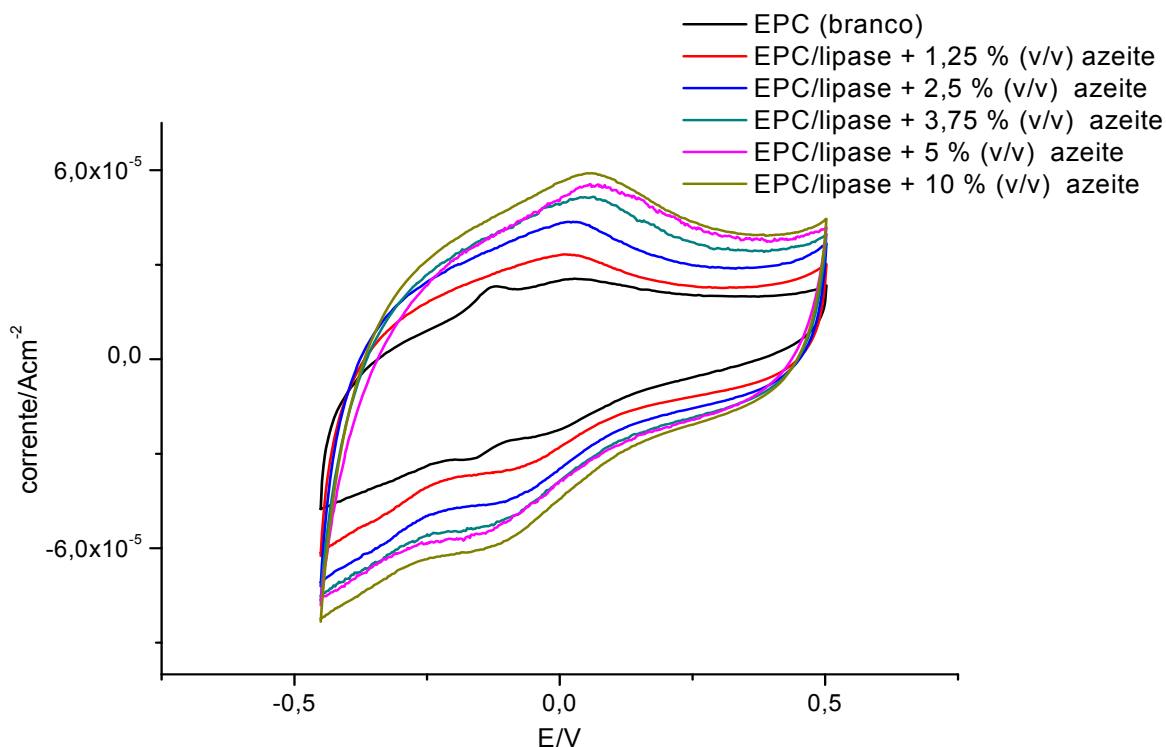
Figura 60 – Voltametria cíclica obtida para o eletrodo de pasta de carbono (EPC) modificado com 400 μL de lipase em concentrações crescentes de óleo de soja. Eletrólito de suporte: tampão fosfato pH 8 $0,05 \text{ molL}^{-1}$ com Triton X-100 (0,4 %, v/v) $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: próprio autor

Outro substrato testado foi o azeite de oliva, uma vez que óleos vegetais são compostos predominantemente por triacilgliceróis (CUNHA; OLIVEIRA, 2006). Os resultados com o eletrodo modificado com 400 μL de lipase não demonstrou bons resultados de resposta. Para cada tipo de substrato é necessário conhecer a quantidade necessária para o seu funcionamento, pois grande quantidade de enzima imobilizada pode causar diminuição na resposta pela repulsão das cargas presentes na estrutura da lipase. A fim de melhorar a resposta, o substrato azeite de oliva foi testado com o EPC modificado com 200 μL de lipase. Os resultados estão na Figura 61.

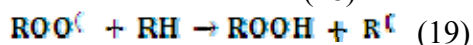
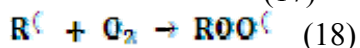
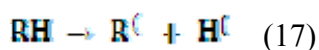
Figura 61 – Voltametria cíclica obtida para o eletrodo de pasta de carbono (EPC) modificada com 200 μL de lipase em concentrações crescentes de azeite de oliva. Eletrólito de suporte: tampão fosfato pH 8 $0,05 \text{ molL}^{-1}$ com Triton X-100 (0,4 %, v/v) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: próprio autor

A adição de azeite à solução levou o aparecimento de um pico de oxidação em 0,03 V. A partir das medidas das diferentes concentrações de azeite nota-se deslocamento deste pico para potenciais mais positivos com o aumento da concentração. O pico de redução foi em torno de -0,127 V e com o incremento da concentração de azeite decresceu.

A lipase hidrolisa o triacilglicerol a glicerol e ácidos graxos (Figura 1) e estes produtos em presença de oxigênio e potencial aplicado forma radicais livres que reagem com o O_2 e formam radicais peróxido (WU; CHENG, 2005):



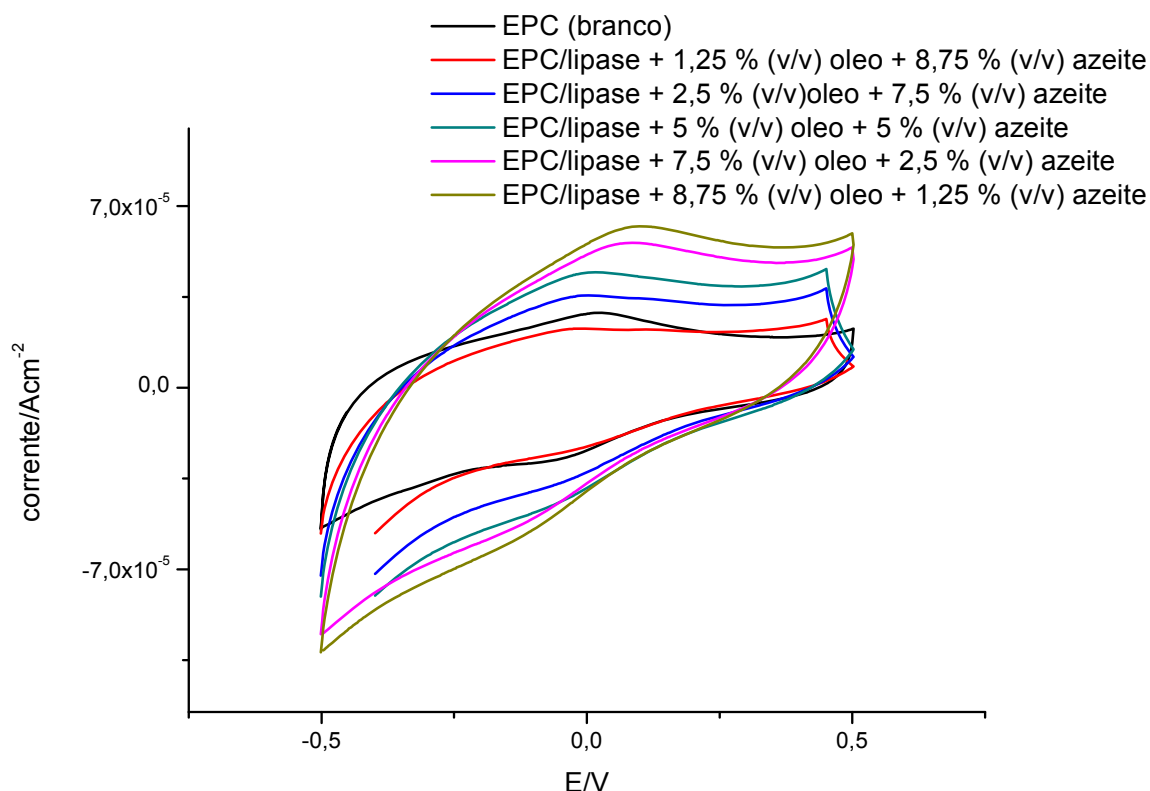
A reação (17) pode ocorrer em presença de luz ou pela aplicação de potencial e a reação (19) é lenta. Geralmente, a análise de triacilglicéris utilizando-

se biossensores ocorre em sistemas com duas ou três enzimas, em presença de enzimas que degradam o glicerol (WU; CHENG, 2005; REJEB et al., 2007).

Desta forma, o sinal de resposta obtido com a lipase de *B. ribis* EC-01 pode ser devido à outra substância eletroativa presente. O óleo de soja e também o azeite possuem compostos fenólicos que podem influenciar na resposta do biossensor, utilizando somente a lipase (PAULIUKAITE et al., 2011). A quantificação direta utilizando lipase foi relatada pelo uso de sensores potenciométricos (REDDY et al., 2001).

O óleo de soja foi combinado ao azeite de oliva no volume final de 2 mL. Essas misturas foram testadas como substratos para verificar o funcionamento do EPC modificado com 200 μL de lipase (Figura 62).

Figura 62 – Voltametria cíclica obtida para o eletrodo de pasta de carbono (EPC) modificado com 200 μL de lipase em misturas de óleo e azeite de oliva. Eletrólito de suporte: tampão fosfato pH 8 $0,05 \text{ molL}^{-1}$ com Triton X-100 (0,4 %, v/v) . $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: próprio autor

Pode-se notar que quando a mistura possui mais quantidade de óleo o pico anódico se assemelha ao pico anódico quando foi utilizado somente o óleo

como substrato. E quando a mistura possui mais azeite o pico anódico se assemelha ao pico anódico quando foi utilizado somente azeite. Estas observações sugerem que o eletrodo de pasta de carbono foi seletivo para cada substrato.

Estes dados são preliminares, mas indicam a aplicabilidade do suporte pasta de carbono na construção destes eletrodos modificados com a lipase de *B. ribis*EC-01. Estudos envolvendo diferentes condições de pH, agitação da solução de eletrólito suporte, concentração dos substratos, entre outros, poderão ser desenvolvidos para melhor complementação destas informações e entendimento do mecanismo das reações. E, dessa forma determinar tempo de resposta e sensibilidade destes bioeletrodos.

CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que *Botryosphaeria ribis* EC-01 produz lipase sob condição de fermentação submersa, quando cultivado nas tortas de soja ou de mamona, como fonte de substratos, em água destilada sem adição de outros nutrientes. Entretanto, quando ambos os substratos foram combinados, em diferentes proporções, não houve aumento significativo na produção de lipase. O glicerol residual (GR), proveniente da indústria de biodiesel diminuiu a produção de lipase, enquanto que o glicerol-PA teve efeito positivo na síntese. A torta de soja foi o substrato que mais influenciou no aumento da produção desta enzima, seguido do glicerol-PA. A otimização de produção de lipase por planejamento fatorial e análise por metodologia de superfície de resposta (MSR) aumentou quatro vezes a síntese desta enzima. A condição ótima foi obtida utilizando 2,37% (m/v) de torta de soja e 4,5 % (v/v) de glicerol, sob agitação de 180 rpm a 28 ° C durante 5 dias, obtendo-se $76,6 \pm 7,97$ U/mL, sendo valor predito de 72,8 U/mL. A maior atividade específica ($138,7 \pm 0,34$ U/mg) foi obtida em 0,6 % (m/v) de torta de soja e 2,8 % (v/v) de glicerol, enquanto que a produção em U/gss foi $4820 \pm 248,8$ U/gss, utilizando-se 0,5 % (m/v) de torta de soja e 5,2 % (v/v) de glicerol. O custo da produção de lipase foi comparado nas três condições otimizadas previamente. A adição de glicerol como nutriente suplementar aumentou os custos da produção embora também tenha proporcionado um aumento dos títulos de produção desta enzima.

Dentre os parâmetros cinéticos determinados do extrato bruto da enzima, o pH ótimo foi 8 em tampão fosfato, a enzima foi estável na faixa de pH de 3-10. A temperatura ótima foi 55 °C e se manteve estável de 30-55 °C. Esta lipase se manteve ativa em metanol, etanol e glicerol a 25, 10 e 50 % (v/v), respectivamente. Os íons Mn^{2+} , Mg^{2+} e Ba^{2+} foram os que proporcionaram maior aumento da atividade da lipase, enquanto que os íons Fe^{3+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} a inibiram parcialmente. Esta lipase confirmou ser uma lipase verdadeira considerando que hidrolisou ésteres de cadeia curta, média e longa, tendo demonstrado maior afinidade pelos de cadeia longa.

Esta lipase foi imobilizada em diversos suportes (carvão ativado de coco, Celite, quitosana em esferas e quitosana em pó) com ou sem a presença de aditivos (glutaraldeído e carbodiimida (EDC)) e o Celite demonstrou ser o melhor suporte proporcionando maior estabilidade e atividade à enzima, sem uso de

aditivos. A lipase imobilizada neste suporte exibiu pH e temperatura ótimos de 8 e 55 °C, respectivamente, e aumentou o tempo de meia vida em até 5 vezes (a 45 °C), comparada à enzima livre.

A lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em Celite foi aplicada na transesterificação de óleo de soja e demonstrou um aumento na conversão de 6 % para 36 % de ésteres metílicos, em relação à enzima livre.

Esta lipase imobilizada em pasta de carbono demonstrou potencial como biossensor, visto que o eletrodo modificado com a enzima respondeu a todos os substratos testados.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho foi precursor na imobilização e aplicação da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01, obtendo bons resultados. Desta forma, sugere-se como futuros trabalhos:

- Aumentar a produção de ésteres através da purificação parcial da lipase de por diferente métodos;
- Avaliar outras fontes de triacilgliceróis na reação de síntese de biodiesel;
- Empregar outros métodos de produção de biodiesel, como a hidrólise prévia do óleo, com esta lipase;
- Testar o reuso da enzima imobilizada no processo de transesterificação;
- Purificar o produto obtido na transesterificação;
- Aplicar a enzima na confecção de biossensores baseados na inibição enzimática;
- Aprimorar os ensaios com os eletrodos modificados com a enzima imobilizada em pasta de carbono.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, H.; HIOL, A.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor sp* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 968-975, 2002.
- AÇIKEL, Ü.; ERŞAN, M.; SAĞ AÇIKEL, Y. The effects of the composition of growth medium and fermentation conditions on the production of lipase by *R. delemar*. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, p. 35-44, 2011.
- ADRIANO, W. S. et al. Optimization of penicillin G acylase multipoint immobilization on to glutaraldehyde–chitosan beads. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 41, p. 201-207, 2005.
- AHAMMAD, A. J. S. LEE, J.-J.; RAHMAN, M. D. A. Electrochemical Sensors Based on Carbon Nanotubes. **Sensors**, v.9, p. 2289-2319, 2009.
- AHMED, K. S. O. H. et al. Preparation and studies on immobilized α -glucosidase from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 72, n. 12, p. 1255-1263, 2007.
- AHUJA, T. et al. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials**, v. 28, p. 791-805, 2007.
- AL-ZUHAIR, S.; DOWAIDAR, A.; KAMAL, H. Dynamic modeling of biodiesel production from simulated waste cooking oil using immobilized lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 256-262, 2009.
- AL-ZUHAIR, S. Enzymatic Production of Bio-Diesel from Waste Cooking Oil Using Lipase. **The Open Chemical Engineering Journal**, v. 2, p. 84-88, 2008.
- AL-ZUHAIR, S. Production of biodiesel: possibilities and challenges. **Biofuels Bioproducts Biorefining**, v. 1, p. 57-66, 2007.
- ANDUALEMA, B.; GESSESSE, A. Microbial Lipase and Their Industrial Applications: Review. **Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 100-118, 2012.
- ANTCZAK, M. S. et al. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1185-1194, 2009.
- AQUINO-NETO, F. D.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.
- AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.2.3, p. 27-34, 2007.
- BAJAJ, A. et al. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 9-14, 2010.
- BALCÃO, V. M; PAIVA, A. L.; MALCATA, X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 392-416, 1996.

BANCERZ, R. et al. Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotrophic fungus *Penicillium chrysogenum* 9'. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 253-260, 2005.

BARBOSA, A.M., DEKKER, R.F.H.; HARDY, G.E. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 93-96, 1996.

BARBOSA, A.M. et al. *In-vivo* decolorisation of Poly R-478 as a method for screening ligninolytic microorganisms for use in bioremediation. **4th Pacific Rim Biotechnol. Conf.**, Melbourne, Australia, Feb 6-9, p. 88-90, 1995.

BARBOSA, A.M. et al. Soybean oil and meal as substrates for lipase production by *Botryosphaeria ribis*, and soybean oil to enhance the production of Botryosphaeran by *Botryosphaeria rhodina*. In: **Soybean, Biochemistry, Chemistry and Physiology**. p. 101-118, Tzi Bun Ng, Intech, Rijeka, Croatia, 2011.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 3.ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2007. p.363-373.

BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIÈRE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 2, p.133-153, 2000.

BEPPU, M. M.; ARRUDA, E. J.; SANTANA, C. C. Síntese e Caracterização de Estruturas Densas e Porosas de Quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. Out/Dez, p. 163-169, 1999.

BEPPU, M.M. et al. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. **Journal of Membrane Science**, v. 301, p. 126-130, 2007.

BETANCOR, L. et al. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 877-882, 2006.

BORKAR, P. S. et al. Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain – *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 358-366, 2009.

BOUCHELTA, C. et al. Preparation and characterization of activated carbon from date stones by physical activation with steam. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 82, p. 70-77, 2008.

BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 54-248, 1976.

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

BUSSAMARA, R. et al. Optimal Conditions for Continuous Immobilization of *Pseudozyma hubeiensis* (Strain HB85A) Lipase by Adsorption in a Packed-Bed Reactor by Response Surface Methodology. **Enzyme Research**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

BUTTERFIELD, D. A. et al. Catalytic biofunctional membranes containing site-specifically immobilized enzyme arrays: a review. **Journal of Membrane Science**, v.181, p. 29-37, 2001.

CABALLERO, V. et al. Sustainable preparation of a novel glycerol-free biofuel by using pig pancreatic lipase: Partial 1,3-regiospecific alcoholysis of sunflower oil. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 334-342, 2009.

CABRAL, J. M. S. et al. **Engenharia Enzimática**. Lisboa: Lidel Edições Técnicas, 2003. 272p.

CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C.; GOODAY, G. W. **The Fungi**. San Diego: Academic Press, 2001. p. 85-184.

CARVALHO, N. M. F. et al. Uso de equações lineares na determinação dos parâmetros de Michaelis-Menten. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1607-1611, 2010.

CASTILHO, L. R. et al. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 239-247, 2000.

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

CHANG, S.-F. et al. Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on Celite by RSM. **Applied Clay Science**, v. 37, p. 67-73, 2007.

CHANIHIAN, H. et al. How Gastric Lipase, an Interfacial Enzyme with a Ser-His-Asp Catalytic Triad, Acts Optimally at Acidic pH. **Biochemistry**, v. 45, p. 993-1001, 2006.

CHARTRAIN, M. et al. Purification and characterization of a novel bioconverting lipase from *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 575-580, 1993.

CHEN, B. et al. Using silk woven fabric as support for lipase immobilization: The effect of surface hydrophilicity/hydrophobicity on enzymatic activity and stability. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, p. 59-66, 2012.

CHEN, H.-C. et al. Continuous Production of Lipase-Catalyzed Biodiesel in a Packed-Bed Reactor: Optimization and Enzyme Reuse Study. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

CHEN, X. et al. Lipase-mediated methanolysis of soybean oils for biodiesel productions. **Journal of Chemical Technolugu and Biotechnology**, v. 83, p. 71-76, 2008.

CHEN, X.; DU, W.; LIU, D. Response surface optimization of biocatalytic biodiesel production with acid oil. **Biochemical Engineering Journal**, v.40, p.423-429, 2008.

CHEN, Y. et al. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. **Energy Conversion and Management**, v. 50, p. 668-673, 2009.

CHERUKUVADA, S. L. et al. Evidence of a Double-Lid Movement in *Pseudomonas aeruginosa* Lipase: Insights from Molecular Dynamics Simulations. **PLoS Computational Biology**, v. 1, n. 3, e 28, p. 182-189, 2005.

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

CHO, S.S. et al. A neutral lipase applicable in biodiesel production from a newly isolated *Streptomyces* sp. CS326. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v. 35, p. 227-234, 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editada da Unicamp, 2006.

COSTA, B. Z. et al. Resíduos Agroindustriais como Fontes de Carbono para a Produção de Lacase e Lipase por Fermentação Submersa. **XVI Encontro de Química da Região Sul**, 2008.

COSTA, B. Z. **Produção de lipases e lacases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 e *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 sob fermentação em fase sólida, em tortas de soja, milho, mamona e azeitona**. 2008. 106 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Química, CCE) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

CUNHA, M. A. A. et al. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of constitutive and inducible laccases by *Botryosphaeria* sp. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, p. 385-392, 2003.

CUNHA, S. C.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Discrimination of vegetable oils by triacylglycerols evaluation of profile using HPLC/ELSD. **Food Chemistry**, v. 95, p. 518-524, 2006.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DALMAU, E. et al. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 657-663, 2000.

DE OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p 932-939, 2006.

DESAI, P. D.; DAVE, A. M.; DEVI, S. Alcoholysis of salicornia oil using free and covalently bound lipase onto chitosan beads. **Food Chemistry**, v. 95, p. 193-199, 2006.

DHAND, C. et al. Polyaniline/Single-Walled Carbon Nanotubes Composite Based Triglyceride Biosensor. **Electroanalysis** v. 22, p. 2683-2693, 2010.

DHARMSTHITI, S.; AMMARANOND, P. Purification and characterization of lipase from a raw-milk yeast (*Trichosporon asteroides*). **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 26, p. 111-116, 1997.

DHARMSTHITI, S.; LUCHAI, S. Production and Immobilization of Lipase from *Aeromonas sobria* Harboring a Heterologous Gene. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 3, p. 335-337, 1998.

DHEEMAN, D. S. et al. Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain *Penicillium* sp. DS-39 (DSM 23773). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 256-262, 2011.

DIZGE, N. et al. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1983-1991, 2009.

DONG, H. et al. Purification and characterization of a *Pseudomonas* sp. Lipase and its properties in non-aqueous media. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 30, p. 251-256, 1999.

DVIR, H. et al. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. **Chemico-Biological Interactions**, v. 187, p. 10-22, 2010.

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

ELNASHAR, M. M. M. Review Article: Immobilized Molecules Using Biomaterials and Nanobiotechnology. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 1, p. 61-77, 2010.

ESSAMRI, M.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. **Journal of Biotechnology**, v. 60, p. 97-103, 1998.

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

FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biosensores. **Química Nova**, v. 15, p. 28-39, 1991.

FERNANDES, S. C. et al. Biosensor based on laccase immobilized on microspheres of chitosan crosslinked with tripolyphosphate. **Sensors and Actuators B**, v. 133, p. 202-207, 2008.

FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1061-1067, 2008.

FERNANDEZ, M.L.M. et al. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p.43-49, 2004.

FERRAZ, L. R. et al. Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 243-252, 2012.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1297-1315, 2009.

FOJAN, P. et al. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. **Biochimie**, v. 82, p. 1033-1041, 2000.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 769-777, 2007.

FREIRE, D. M. et al. Lipase production by a new promising strain *Penicillium restrictum*. **Revista de Microbiologia**, v. 28, n. 1, p. 6-12, 1997.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H., Review: Biodiesel Fuel Production By Transesterification Of Oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.92, n.5, p. 405-416, 2001.

GAMA, F.M.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. **Engenharia enzimática**. Lisboa: Lidel, 2003. 227p.

GAO, Y.-Y. et al. Optimization of transesterification conditions for the production of fatty acid methyl ester (FAME) from Chinese tallow kernel oil with surfactant-coated lipase. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 277-282, 2009.

GAUR, R.; GUPTA, A.; KHARE, S.K. Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. **Process Biochemistry**, v. 43, p.1040-1046, 2008.

GHALY, A. E. et al. Production of Biodiesel by Enzymatic Transesterification: Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, n.2, p. 54-76, 2010.

GHAMGUI, H.; KARRA-CHAËBOUNI, M.; GARGOURI, Y. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between *n*-hexane and solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 355-363, 2004.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v.63, p.1721-1754, 2007.

- GHIACI, M. et al. Enzyme immobilization Part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Applied Clay Science**, v. 43, p. 289-295, 2009.
- GHOSH, P. K. et al. Microbial lipases: production and applications. **Science Progress**, v. 79, n. 2, p.119-157, 1996.
- GOBBETTI, M. et al. Study of the effects of temperature, pH, NaCl and aw on the proteolytic and lipolytic activities of cheese-related lactic acid bacteria by quadratic response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 795-809, 1999.
- GOLDBERG, M. E.; CHAFFOTTE, A. F. Undistorted structural analysis of soluble proteins by attenuated total reflectance infrared spectroscopy. **Protein Science**, v. 14, p. 2781-2792, 2005.
- GOMES, F. M. et al. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildimidazol. **Química Nova**, vol. 29, n. 4, p. 710-718, 2006.
- GUERFALI, M. et al. Catalytic properties of the immobilized *Talaromyces thermophilus* β -xylosidase and its use for xylose and xylooligosaccharides production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, p. 242-249, 2009.
- GUNASEKARAN, V.; DAS, D. Lipase fermentation: Progress and prospects. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 437-445, 2005.
- HALIM, S. F. A.; KAMARUDDIN, A. H. Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a *tert*-butanol system. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1436-1439, 2008.
- HAMA, S. et al. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v.34, p.273-278, 2007.
- HARTREE E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v.48, p.422-427, 1972.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.235-251, 2006.
- HASAN, F. et al. Enzymes used in detergents: Lipases. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 31, p. 4836-4844, 2010.
- HA, S. H. et al. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids. **Enzyme and Microbial Technology** v. 41, p. 480-483, 2007.
- HE, Y. Q.; TAN, T. W. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, n 1-4, p. 9-14, 2006.

HIOU, A. et al. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 80-87, 1999.

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

HOSSEINPOUR, M. N. et al. Submerged culture studies for lipase production by *Aspergillus niger* NCIM 584 on soya flour. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 7, n. 3, p. 362-366, 2011.

HSIEH, C-T.; TENG, H. Influence of mesopore volume and adsorbate size on adsorption capacities of activated carbons in aqueous solutions. **Carbon**, v. 38, p. 863-869, 2000.

HSU, A.-F. et al. Production of Alkyl Esters from Tallow and Grease Using Lipase Immobilized in a Phyllosilicate Sol-Gel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 6, p. 585-588, 2001.

HUANG, Y.; LOCY, R.; WEETE, J. D. Purification and Characterization of an Extracellular Lipase from *Geotrichum marinum*. **Lipids**, v. 39, n. 3, p. 251-257, 2004.

HUANG, Y.; ZHENG, H.; YAN, Y. Optimization of Lipase-Catalyzed Transesterification of Lard for Biodiesel Production Using Response Surface Methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 504-515, 2010.

HUNG, T.-C. et al. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 26, p. 69-78, 2003.

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

JAEGER, K-E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M. T. Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

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

JAEGER, K-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JEGANNATHAN, K. R. et al. Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase-A Critical Review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.28, p. 253-264, 2008.

JOSEPH, B. et al. Standard Review Cold-active microbial Lipases: a versatile tool for industrial applications. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, vol. 2, n.2, p. 39-48, 2007.

KAEWTHONG, W. et al. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1525-1530, 2005.

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

KANWAR, L.; OSWAMI, P. Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its application in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilised lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 727-735, 2002.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 555-569, 2012.

KARTAL, F.; KILINÇ, A.; TIMUR, S. Lipase biosensor for tributyrin and pesticide detection. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 87, n. 10-11, p. 715-722, 2007.

KASHMIRI, M. A.; ADNAN, A.; BUTT, B. W. Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma Viride*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n.10, p. 878-882, 2006.

KATHIVARAN, T. et al. Studies on nutritional requirements of *Pseudomonas aeruginosa* for lipase production. **Advances in Applied Science Research**, v. 3, n. 1, p. 591-598, 2012.

KAZLAUSKAS, R. J. Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: prospects for predicting and engineering catalytic properties. **Trends in Biotechnology**, v. 12, p. 464-472, 1994.

KIERKELS, J. G. T. et al. Lipase kinetics: On-line measurement of the interfacial area of emulsions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, p. 760-763, 1990.

KNEZEVIC, Z.; MOJOVIC, L.; ADNADJEVIC, B. Palm oil hydrolysis by lipase from *Candidacylindracea* immobilized on zeolite type Y. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 275-280, 1998.

KOJIMA, Y.; YOKOE, M.; MASE, T. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 9, p. 1564-1568, 1994.

KÖSE, O.; TÜTER, M.; AKSOY, H. A. Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 125-129, 2002.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126-139, 2004.

KROUMOV, A. D.; MÓDENES, A. N.; WENZEL, B. M. Desenvolvimento de um modelo da cinética enzimática da transesterificação de óleos vegetais para produção de biodiesel, **Acta Scientiarum Technology**, v. 29, n. 1, p. 9-16, 2007.

KUMAR, A.; KANWAR, S. S. Synthesis of ethyl ferulate in organic medium using celite-immobilized lipase. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2162-2167, 2011.

KUMARI, A.; GUPTA, R. Purification and biochemical characterization of a novel magnesium dependent lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54 and its application in biodiesel production. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 70-82, 2012.

KUMARI, A. et al. Enzymatic transesterification of Jatropha oil. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n.1, p. 1-7, 2009.

KUMARI, V.; SHAH, S.; GUPTA, M. N. Preparation of Biodiesel by Lipase-Catalyzed Transesterification of High Free Fatty Acid Containing Oil from *Madhuca indica*. **Energy & Fuels**, v. 21, p. 368-372, 2007.

KUMAR, S.; DUTTA, P.K.; KOH, J. A physico-chemical and biological study of novel chitosan-chloroquinoline derivative for biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 356-361, 2011.

KWON, S. J.; HAN, J. J.; RHEE, J. S. Production and in situ separation of mono- or diacylglycerol catalyzed by lipases in *n*-hexane. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 700-704, 1995.

LAI, C.-C. et al. Lipase-catalyzed production of biodiesel from rice bran oil. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p. 331-337, 2005.

LEE, J. H. et al. Biodiesel production by a mixture of *Candida rugosa* and *Rhizopus oryzae* lipases using a supercritical carbon dioxide process. **Bioresource Technology**, v. 102, p 2105-2108, 2011.

LI, L.; DU, W.; LIU, D.; WANG, L.; LI, Z. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction médium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p. 58-62, 2006.

LIMA V. M. G. et al. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v.18, p.65-71, 2004.

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

LI, W.; DU, W.; LIU, D. Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, p. 122-127, 2007.

LI, Z. et al. Enzymatic Synthesis of Fatty Acid Methyl Esters from Crude Rice Bran Oil with Immobilized *Candida* sp. 99-125. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 5, p. 870-875, 2010.

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

LIN, S.-F. et al. Purification and Partial Characterization of an Alkaline Lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1093-1095, 1996.

LIU, C.-H.; CHEN, W.-M.; CHANG, J.-S. Methods for rapid screening and isolation of bacteria producing acidic lipase: feasibility studies and novel activity assay protocols. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 633-640, 2007.

LIU, C.-H. et al. Optimizing lipase production from isolated *Burkholderia* sp. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 43, p. 511-516, 2012a.

LIU, C.-H. et al. Biodiesel production by enzymatic transesterification catalyzed by *Burkholderia* lipase immobilized on hydrophobic magnetic particles. **Applied Energy**, v. 100, p. 41-46, 2012b.

LIU, C.-H. et al. Characterization of *Burkholderia lipase* immobilized on celite carriers. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, p. 359-363, 2009a.

LIU, C.-H.; LU, W.-B.; CHANG, J.-S. Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. by response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1940-1944, 2006.

LIU, C.-X. et al. LiCl-induced improvement of multilayer nanofibrous lipase for biodiesel synthesis. **Bioresource Technology**, v. 103, p. 266-272, 2012c.

LIU, J.; ZHANG, Y. Optimisation of lipase production by a mutant of *Candida antarctica* DSM-3855 using response surface methodology. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 695-701, 2011.

LIU, R. et al. A novel low-temperature resistant alkaline lipase from a soda lake fungus strain *Fusarium solani* N4-2 for detergent formulation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 265-270, 2009b.

LOTRAKUL, P.; DHARMSTHITI, S. Lipase production by *Aeromonas sobria* LP004 in a medium containing whey and soybean meal. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 163-166, 1997.

LOUWRIER, A. Industrial products – the return to carbohydrate-based industries. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 27, p. 1-8, 1998.

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

MAIA, M.M.D. et al. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 23-27, 2001.

MALA, J. G. S. et al. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 53, p. 247-253, 2007.

MALA, J. G. S.; TAKEUCHI, S. Understanding Structural Features of Microbial Lipases-An Overview. **Analytical Chemistry Insights**, v. 3, p. 9-19, 2008.

MALCATA, F. X. et al. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 426-446, 1992.

MAKHZOUM, A.; KNAPP, J. S.; OWUSU, R. K. Factors affecting growth and extracellular lipase production by *Pseudomonas fluorescens* 2D. **Food Microbiology**, Vol. 12, p. 277-290, 1995.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.11, p. 1300-1311, 2007.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MATEO, C. et al. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 509-515, 2000.

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

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MENG, Y. et al. Two-step synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 6-15, 2011.

MENONCIN, S. et al. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 440-443, 2009.

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

MESSIAS, J. M. **Produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em diferentes fontes de carbono**. 2008. 229 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

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

MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, p. 790-802, 2004.

MILETIĆ, N.; NASTASOVIĆ, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 126-135, 2012.

MINAKSHI; PUNDIR, C.S. Construction of an amperometric enzymic sensor for triglyceride determination. **Sensors and ActuatorsB**, v. 133, p. 251-255, 2008.

MITTELBACH, M. Lipase Catalyzed Sunflower Oil. **JAACS**, v. 67, n. 3, p. 168-170, 1990.

MODI, M. K. et al. Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. **Bioresource Technol.**, v. 98, p. 1260-1264, 2007.

MONIER, M. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on modified natural wool fibers. **Reactive & Functional Polymers**, v. 70, p. 122-128, 2010.

MONTEIRO JR, O. A. C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 119-128, 1999.

MORENO-PIRAJAN, J.C.; GIRALDO, L. Study of immobilized *Candida rugosa* lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 4, p. 55-62, 2011.

MURALIDHAR, R. V. et al. A response surface approach the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, p. 17-23, 2001.

MURTY, V. R.; BHAT, J.; MUNISWARAN, P. K. A. Hydrolysis of Oils by Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review. **Biotechnologu Bioprocess Engeneering**, v. 7, p. 57-66, 2002.

NAHAS, E. Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growth conditions. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 227-233, 1988.

NAKANISHI, K.; SAKIYAMA, T.; IMAMURA, K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, p. 233-244, 2001.

NAOE, K. et al. Esterification by *Rhizopus delemar* lipase in organic solvent using sugar ester reverse micelles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, p. 67-72, 2001.

- NARANJO, J.C. et al. Lipase supported on granular activated carbon and activated carbon cloth as a catalyst in the synthesis of biodiesel fuel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 166-171, 2010.
- NASRATUN, M. et al. Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Chitosan Beads for Transesterification Reaction. **American Journal of Applied Sciences**, v. 6, n. 9, p. 1653-1657, 2009.
- NGUYEN, D. et al. Bleaching of kraft pulp by a commercial lipase: Accessory enzymes degrade hexenuronic acids. **Enzyme and Microbial Technology**, v.43, p.130-136, 2008.
- NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v.96, p. 769-777, 2005.
- OHNISHI, K.; YOSHIDA, Y.; SEKIGUCHI, J. Lipase production of *Aspergillus oryzae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, p. 490-495, 1994.
- PANUTHAI, T. et al. An extracellular lipase from the endophytic fungi *Fusarium oxysporum* isolated from the Thai medicinal plant, *Croton oblongifolius* Roxb. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 11, p. 2622-2638, 2012.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, vol. 29, n 1, p. 93-99, 2006.
- PARAWIRA, W. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 29, p. 82-93, 2009.
- PASQUEVICH, M. Y. et al. Triacylglycerol catabolism in the prawn *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemoniade). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, v. 160, p. 201-207, 2011.
- PASTORE, M. G. et al. 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. 101-106, 2003.
- PAULIUKAITE, R. et al. Application of room temperature ionic liquids to the development of electrochemical lipase biosensing systems for water-insoluble analytes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 656, p. 96-101, 2011.
- PENCREAC'H, G.; BARATTI, J.C. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media. **Enzyme Microbial Technology**, v.18, p. 417-422, 1996.
- PETKAR, M.; LALI, A.; CAIMI, P.; DAMINATI, M. Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 83-90, 2006.

- POGORI, N. et al. Production and biochemical characterization of an extracellular lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021. **Biotechnology**, v. 7, p. 710-717, 2008.
- POURJAVADI, A. et al. CMC/Celite Superabsorbent Composites: Effect of Reaction Variables on Saline-absorbency under Load. **Iranian Polymer Journal**, v.19, n. 8, p. 571-579, 2010.
- PUNDIR, C.S.; SINGH, B. S.; NARANG, J. Construction of an amperometric triglyceride biosensor using PVA membrane bound enzymes. **Clinical Biochemistry**, v. 43, p. 467-472, 2010.
- RAHMAN, R. N. Z. R. A. et al. S5 Lipase : An Organic Solvent Tolerant Enzyme. **The Journal of Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 583-590, 2006.
- RAITA, M.; CHAMPREDA, V.; LAOSIRIPOJANA, N. Biocatalytic ethanolysis of palm oil for biodiesel production using microcrystalline lipase in *tert*-butanol system. **Process Biochemistry**, v.45, p. 829-834, 2010.
- RAMACHANDRAN, S. et al. Oil cakes and their biotechnological applications – A review. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2000-2009, 2007.
- RAMANI, K. et al. Immobilisation of *Pseudomonas gessardii* acidic lipase derived from beef tallow onto mesoporous activated carbon and its application on hydrolysis of olive oil. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 986-992, 2010.
- RAMANI, K. et al. Surface functionalized mesoporous activated carbon for the immobilization of acidic lipase and their application to hydrolysis of waste cooked oil: Isotherm and kinetic studies. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 435-445, 2012.
- RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3975-3981, 2008.
- REDDY, K. G. et al. Determination of Carbophenothion and Dibrom Pesticides by Liquid Phase Lipase Enzyme by Voltammetric Methods. **Analytical and Bioanalytical Electrochemistry**, vol. 4, p. 457-467, 2012.
- REDDY, K. S. K.; SHOAIBI, A. A.; SRINIVASAKANNAN, C. A comparison of microstructure and adsorption characteristics of activated carbons by CO₂ and H₃PO₄ activation from date palm pits. **New Carbon Materials**, v. 27, n. 5, p. 344-351, 2012.
- REDDY, R. R. K.; CHADHA, A.; BHATTACHARYA, E. Porous silicon based potentiometric triglyceride biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, p. 313-317, 2001.
- REDONDO, O. et al. Comparative kinetic study of lipases A and B from *Candida rugosain* the hydrolysis of lipid p-nitrophenyl esters in mixed micelles with Triton X-100. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1243, p. 15-24, 1995.
- REIS, P. et al. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147-148, p. 237-250, 2009.

- REJEB, I. B. et al. Amperometric biosensor based on Prussian Blue-modified screen-printed electrode for lipase activity and triacylglycerol determination. **Analytica Chimica Acta**, v. 594, p. 1–8, 2007.
- RIGO, E. et al. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 1132-1137, 2010.
- RODRIGUES, D. S. et al. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, p. 100-109, 2008.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**, Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.
- RODRIGUEZ, J. A. et al. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2264-2269, 2006.
- ROMDHANE, I. B.-B. et al. A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 112-120, 2010.
- ROYON, D. et al. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent. **Bioresource Technol.**, v. 98, n. 3, p. 648-653, 2007.
- RUBINGH, D. N. The influence of surfactants on enzyme activity. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 1, p. 598-603, 1996.
- SAAD, M. M.; KANSO, A. L.; GADALLAH, M. A. Optimization of extracellular lipase production by *Fusarium oxysporum*. **Arabian Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 19-28, 2005.
- SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 291-299, 2005.
- SALUM, T. F. C. et al. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed reactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1348-1354, 2010.
- SÁNCHEZ, E. M.; FELIPE BELLE, J.; ROIG, M. G.; BURGUILLO, F. J.; MORENO, J. M.; SINISTERRA, J. V. Kinetic and enantioselective behavior of the lipase from *Candida cylindracea*: A comparative study between the soluble enzyme and the enzyme immobilized on agarose and silica gels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 468-476, 1996.
- SANGEETHA, R.; ARULPANDI, I.; GEETHA, A. Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: An overview. **Research Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 1-24, 2011.

- SANGEETHA, R.; GEETHA, A.; ARULPANDI, I. Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* vsg1: production, purification and characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 41, p. 179-185, 2010.
- SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 489-511, 2012.
- SATAR, R.; HUSAIN, Q. Applications of Celite-adsorbed white radish (*Raphanus sativus*) peroxidase in batch process and continuous reactor for the degradation of reactive dyes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 96-104, 2009.
- SAXENA, R.K. et al. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v. 39, p.239-247, 2003.
- SCHERER, R. et al. Screening of Supports for Immobilization of Commercial Porcine Pancreatic Lipase. **Materials Research**, v. 14, n. 4, p. 483-492, 2011.
- SEKHON, A. et al. Production of extracellular lipase by *Bacillus megaterium* AKG-1 in submerged fermentation. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 179-183, 2006.
- SHAH, S.; GUPTA, M. N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 409-414, 2007.
- SHAH, S.; SHARMA, S.; GUPTA, M. N. Biodiesel Preparation by Lipase-Catalyzed Transesterification of *Jatropha* Oil. **Energy and Fuels**, v. 18, p. 154-159, 2004.
- SHAO, P. et al. Analysis of immobilized *Candida rugosa* lipase catalyzed preparation of biodiesel from rapeseed soapstock. **Food and Bioproducts Processing**, v. 86, p. 283-289, 2008.
- SHARMA, D.; SHARMA, B.; SHUKLA, A. K. Biotechnological approach of microbial lipase: a review. **Biotechnology**, v. 10, p. 23-40, 2011.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, p.627-662, 2001.
- SHU, C.-H.; XU, C.-J.; LIN, G.-C. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 734-738, 2006.
- SILVA, J. A. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 16-24, 2012.
- SILVA, V. C. F.; CONTESINI, F. J.; CARVALHO, P. O. Characterization and Catalytic Activity of Free and Immobilized Lipase from *Aspergillus niger*: a Comparative Study. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 8, p. 1468-1474, 2008.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of Fungal Lipase: A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 486-520, 2012.

SOLANKI, P. R. et al. Nanostructured cerium oxide film for triglyceride sensor. **Sensors and Actuators B**, v. 141, p. 551-556, 2009.

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

SOUZA, K. V.; ZAMORA, P. G. P.; ZAWADZKI, S. F. Esferas de Quitosana/Fe na Degradação do Corante Azul QR-19 por Processos Foto-Fenton Utilizando Luz Artificial ou Solar. **Polímeros**, v. 20, n. 3, p. 210-214, 2010.

STARODUB, N. F. Biosensors for the evaluation of lipase activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p. 155-160, 2006.

STEHR, F. et al. Microbial lipases as virulence factors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, p. 347-355, 2003.

STUER, W.; JAEGER, K.E.; WINKLER, U.K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v.168, p.1070-1074, 1986.

SULONG, M. R. et al. A novel organic solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* 205y: Extracellular expression of a novel OST-lipase gene. **Protein Expression and Purification**, v. 49, p. 190-195, 2006.

SUMNER, J. L. . Growth and sporulation of *Mucor pusillus*. **Transactions of the British Mycological Society**, Vol. 55, No. 2, p. 283-292, 1970.

SUPAKDAMRONGKUL, P.; BHUMIRATANA, A.; WIWAT, C. Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, p. 228-235, 2010.

SZTAJER, H. et al. Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. **Biochim Biophys Acta– Lipids and Lipid Metabolism**, v.1124, p. 253-261, 1992.

SZTAJER, H. MALISZEWSKA, I. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. **Biotechnology Letters**, v. 11, p. 895-898, 1989.

TAN, T. et al. Screening of high lipase producing *Candida sp.* and production of lipase by fermentation. **Process Biochemistry**, Vol. 39, No 4, p. 459-465, 2003.

TAN, T. et al. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1495-1502, 2004.

TENG, Y.; XU, Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. **Bioresource Technology**, Vol. 99, No 9, p. 3900-3907, 2008.

TING, W.-J. et al. An enzymatic/acid-catalyzed hybrid process for biodiesel production from soybean oil. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, v. 39, p. 203-210, 2008.

TING, W.-J. et al. Application of Binary Immobilized *Candida rugosa* Lipase for Hydrolysis of Soybean Oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.42, p.32-38, 2006.

TISCHER, W.; WEDEKIND, F. Immobilized Enzymes: Methods and Applications. **Topics in Current Chemistry**, v. 200, p. 95-126, 1999.

TOMIN, A. et al. Fine-tuning the second generation sol-gel lipase immobilization with ternary alkoxy silane precursor systems. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 52-58, 2011.

TUTAR, H. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on sporopollenin from *Lycopodium clavatum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, p. 315-320, 2009.

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

U.S.D.A. Economic Research Service, World Agricultural Supply and Demand Estimates. **WASDE-493**, p. 1-39, 2011.

VERDUGO, C. et al. Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization by response surface methodology. **Catalysis Today**, v. 167, p. 107-112, 2011.

VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997.

VERGER, R.; MIERAS, M. C. E.; DE HAAS, G. H. Action of Phospholipase A at Interfaces. **The Journal of Biological Chemistry**, v.248, p. 4023-4034, 1973.

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

VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbial Genetics Bulletin**, v.13, p.42-43, 1956.

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

WANG, L. et al. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in *tert*-butanol system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p. 29-32, 2006.

- WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, p. 663-670, 1979.
- WU, L-C.; CHENG, C-M. Flow-injection enzymatic analysis for glycerol and triacylglycerol. **Analytical Biochemistry**, c. 346, p. 234-240, 2005.
- WU, M. et al. Cloning of an Alkaline Lipase Gene from *Penicillium cyclopium* and Its Expression in *Escherichia coli*. **Lipids**, v. 38, n. 3, p. 191-199, 2003.
- XIE, W.; MA, N. Immobilized Lipase on Fe₃O₄ Nanoparticles as Biocatalyst for Biodiesel Production. **Energy and Fuel**. v. 23, p. 1347-1353, 2009.
- XIE, W.; WANG, J. Immobilized lipase on magnetic chitosan microspheres for transesterification of soybean oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 36, p. 373-380, 2012.
- YAGIZ, F.; KAZAN, D.; AKIN, A. N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. **Chemical Engineering Journal**, v. 134, p. 262-267, 2007.
- YANG, F.; HANNA, M.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol--a byproduct of biodiesel production. **Biotechnol Biofuels**, v. 5, p. 1-10, 2012.
- YANG, J.S. et al. Enzymatic methanolysis of castor oil for the synthesis of methyl ricinoleate in a solvent-free medium. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.15, n. 6, p.1183-1188, 2005.
- YAN, J. et al. Gene cloning, overexpression and characterization of a novel organic solvent tolerant and thermostable lipase from *Galactomyces geotrichum* Y05. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49, p. 28-35, 2007.
- YE, P. et al. Comparison of hydrolytic activities in aqueous and organic media for lipases immobilized on poly(acrylonitrile-co-maleic acid) ultrafiltration hollow fiber membrane. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 32, p. 115-121, 2005.
- YEŞİLOĞLU, Y. Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2155-2159, 2005.
- YOO, H.-Y. et al. A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6104-6111, 2011.
- YU, X.-W. et al. High-level expression and characterization of a chimeric lipase from *Rhizopus oryzae* for biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels** v. 6, p.,29-38, 2013.
- ZANPHORLIN, L. M. et al. Production, partial characterization, and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3 p 331-336, 2010.
- ZENG, H-Y. et al. Characterization of the lipase immobilized on Mg–Al hydrotalcite for biodiesel. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 791-798, 2009.

ZHENG, Y.-Y. et al. Thermophilic lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Gene cloning, expression and characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, p. 127-132, 2011.

ZIMA, J.; ŠVANCARA, I.; BAREK, J.; VYTRÁS, K. Recent Advances in Electroanalysis of Organic Compounds at Carbon Paste Electrodes. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 39, p. 204-227, 2009.

ANEXOS

ANEXO A

Artigo publicado no periódico Applied Biochemistry and Biotechnology

Lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on soybean and castorbean meals: Optimization, immobilization and application for biodiesel production¹

Milena M. Andrade^a, Aneli M. Barbosa^{b, c*}, Matheus R. Bofinger^a, Robert F. H. Dekker^c,
Josana M. Messias^{b, #}, Carmen L. B. Guedes^a, Tiago Zaminelli^b, Bruno H. de Oliveira^d, Valéria
M. G. de Lima^d, Luiz H. Dall'Antonia^a

^a Departamento de Química, and ^b Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, CCE –
Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-990, Londrina – PR, Brazil

^c Biorefining Research Institute, Lakehead University, Thunder Bay, Ontario,
Canada P7B 5E1

^d Departamento de Ciências Biológicas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho (UNESP), CEP 19806-900, Assis – SP, Brazil

* Corresponding author: Dr Aneli M Barbosa at Biorefining Research Institute, Lakehead University, Thunder Bay, Ontario, Canada P7B 5E1. E-mail: anelibarbosa@gmail.com

Present address: Departamento de Bioquímica e Imunologia, FMRP – Universidade de São Paulo, CEP: 14049-900, Ribeirão Preto – SP, Brazil

¹Este texto corresponde ao artigo publicado em: ANDRADE, M. M.; BARBOSA, A. M.; BOFINGER, M. R.; DEKKER, R. F. H.; MESSIAS, J. M.; GUEDES, C. L. B.; ZAMINELLI, T.; OLIVEIRA, B. H.; LIMA, V. M. G.; DALL ANTONIA, L.H. Lipase Production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on Soybean and Castorbean Meals: Optimization, Immobilization, and Application for Biodiesel Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p. 1792-1806, 2013.

Abstract The effects of soybean and castorbean meals were evaluated separately, and in combinations at different ratios, as substrates for lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 in submerged fermentation using only distilled water. The addition of glycerol-AG (analytical grade) and CG (crude) to soybean and castorbean meals separately and in combination, were also examined for lipase production. Glycerol-AG increased enzyme production, while glycerol-CG decreased it. A 2^4 factorial design was developed to determine the best concentrations of soybean meal, castorbean meal, glycerol-AG and KH_2PO_4 to optimize lipase production by *B. ribis* EC-01. Soybean meal and glycerol-AG had a significant effect on lipase production, while castorbean meal did not. A second treatment (2^2 factorial design central composite) was developed, and optimal lipase production (4,820U/gds) was obtained when *B. ribis* EC-01 was grown on 0.5%(w/v) soybean meal and 5.2% (v/v) glycerol in distilled water, which was in agreement with the predicted value (4,892U/gds) calculated by the model. The unitary cost of lipase production determined under the optimized conditions developed ranged from \$US 0.42-0.44 based on nutrient costs. The fungal lipase was immobilized onto Celite, and showed high thermal stability and was used for transesterification of soybean oil in methanol (1:3) resulting in 36% of fatty acyl alkyl ester content. The apparent K_m and V_{max} were determined and were 1.86mM and 14.29 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$, respectively.

Keywords Lipase production; Agro-industrial residues; Submerged fermentation; Response Surface Method; Glycerol; Immobilization; Celite

Introduction

Agro-industrial residues such as sugarcane bagasse, cereal straws (wheat, rice), corn stover and cobs, and plant seed oil-extracted residues or meals (e.g., soybean) are excellent sources of nutrients for the cultivation of microorganisms to produce chemical products (enzymes, alcohols, organic acids, solvents, amino acids). Plant seed-oil meals can contain up to 50 % protein together with carbohydrates and residual lipids(20), and are used primarily as animal feeds (ruminants, poultry, fish). They are also an excellent fermentation feedstock to cultivate microorganisms for the production of enzymes such as lipases (2, 20). Soybean meal chemical composition was previously described to be mainly constituted by 30.7 % carbohydrate, 0.7 % lipids, and 49.4 % protein, while castor bean meal 47.2 %, 1.4 %, 31.8 %, respectively, of the same biomolecules (2). Soybean meal dominates the oil-seed “cake/meal” market with a worldwide production of 177.8 million tones in 2010-11, of which Brazil produced 27.9 million tones and is ranked third in the world(24).

Lipases (EC 3.1.1.3; triacylglycerol acylhydrolases) hydrolyse triacylglycerols with long fatty acid chains liberating free fatty acids and glycerols, and do this at the lipid-water interface. These enzymes are widely distributed in microorganisms, plants and animals(22), and their industrial applications are limited because of the high costs associated with their production. The use of agro-industrial residues as fermentation feedstocks for the production of lipases aids the recycling of processing wastes and adds value thereby decreasing the final cost of producing these enzymes(18).

Glycerol (propane-1,2,3-triol) is an important metabolite produced endogenously during metabolism of glucose, pyruvate, proteins, and glycerolipids in prokaryotic and eukaryotic cells(4). This metabolite is involved in several vital physiological reactions that make it a suitable carbon source for some bacteria and fungi to produce bio-based chemicals. Glycerol is known to act as an inducer of lipases in some microorganisms(7, 8, 12). Glycerol is the main by-product arising from commercial biodiesel production (~10 % based on biodiesel), and because of the increasing demand for biodiesel as a fuel stock, the amount of crude glycerol generated globally is estimated to increase significantly in the future. New applications of crude glycerol are therefore sought, and its use as a fermentation feedstock to produce value-added chemicals is an important application(27).

The ascomycete *Botryosphaeria ribis* EC-01 was previously selected as the best producer of lipases among nine isolates of *Botryosphaeria* spp. when cultivated on soybean oil and glycerol-AG (analytical grade) by submerged fermentation (SmF)(16). In related studies, three oil-seed meals (castorbean, corn kernel,soybean) were evaluated as fermentation substrates for the production of lipases by *B. ribis* EC-01 using SmF when supplemented with minimum salts medium. The addition of minimum salts medium to the meals strongly decreased lipase production with castorbean and soybean meals as substrates. Addition of phosphates (KH_2PO_4 and K_2HPO_4) as nutrient supplements enhanced lipase production by this fungal isolate when cultivated on soybean meal, and KH_2PO_4 specifically enhanced lipase production in terms of specific activity(2).

The lipase-catalyzed transesterification reaction is increasingly becoming attractive for biodiesel production because of its eco-friendliness; *green* technology, but may disfavor its application because of the cost of the enzymes. Enzyme immobilization not only allows their recovery but also their reuse thereby decreasing the final cost of the overall process. Much research has been conducted on lipase preparations (free or immobilized) for biodiesel synthesis (23). Various support materials such as chitosan (6), resins (19), wool fibers (17), magnetic particles (13) and Celite (5) involving various techniques for binding enzymes

have been used for immobilization. Adsorption is the most widely used technique for enzyme immobilization as it's simple and of low cost, but the forces between enzyme and support are weak, but have minimal effect on the activity of the immobilised enzyme (1, 25).

In this work, the influence of castorbean and soybean meals as substrates, as well as glycerol (glycerol-AG and glycerol-CG; analytical grade, and crude industrial by-product from biodiesel, respectively) and KH_2PO_4 , with no added nutrients (only distilled water), were evaluated for lipase production by *B. ribis* EC-01 in SmF using factorial design, and analysis by response surface methodology (RSM). Lipase production was optimized and the predicted results confirmed experimentally. The lipase titer obtained (4,820 U/g ds) is to the author's knowledge, the highest yet reported for a microbial lipase. The cost of enzyme production was estimated under the optimized conditions developed. The immobilization of this lipase onto Celite and its application in the transesterification of soybean oil to biodiesel is also discussed.

Material and methods

Materials

Soybean meal was a kind gift from Importação, Exportação e Indústria de Óleos S.A. (Cambé-PR, Brazil). Glycerol-CG, a by-product from biodiesel production, was kindly provided by BIOPAR – Bioenergia do Paraná Ltda, Rolândia-PR, Brazil. Castorbean meal was purchased from Remy Comércio e Beneficiamento de Mamona, Londrina-PR, Brazil. *p*-Nitrophenyl esters (acetate, butyrate, caproate, caprate, palmitate and stearate), and Celite[®] 545 used for immobilization were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Commercial soybean oil used was donated by Caramuru Alimentos S.A. (Apucarana-PR, Brazil). Glycerol-AG and others reagents were of analytical grade.

Fungal isolate and cultivation

Botryosphaeria ribis EC-01 (GenBank Accession Number DQ852308) was maintained on potato-dextrose agar slants at 4.0 ± 2 °C, and sub-cultured at three-monthly intervals. *B. ribis* EC-01 was transferred to agar plates containing glucose (10 g/L), Vogel minimum salts medium (VMSM(26)), agar (20 g/L), and left at 28 ± 2 °C for 5 days. Following growth, four plugs of 0.7 cm-diameter were taken from the mycelial-colonized agar plates and used to inoculate 125 mL Erlenmeyer flasks containing the oil-seed meals (castorbean, soybean) in 25 mL distilled water, and incubated at 28 °C (180 rpm) for 120 h. Five-day old cultures of *B. ribis* EC-01 were harvested by centrifugation ($1500 \times g/15$ min), and the supernatant

recovered was dialyzed against de-ionized water, lyophilized and used as the source of lipase (CLE).

Lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01

The effect of soybean and castorbean meals, their combination, and the addition of glycerol

The effect of soybean and castorbean meals separately, as well as in combination in different proportions, was examined as substrates for lipase production by *B. ribis* EC-01 in SmF using 1% (w/v) soybean meal or castorbean meal, or both proportionately combined (% w/v) in the following ratios 1:1, 1:3 and 3:1. Glycerol-AG and/or glycerol-CG were also added to Erlenmeyer flasks containing castorbean and soybean meals (ratio 3:1 %, w/v) in distilled water at concentrations of 2 and 4 % (v/v). The fungal isolate was grown at 28 °C (180 rpm) for 120 h.

Factorial design and analysis by RSM

A 2^4 factorial design (*treatment 1*) with three replicates at the central point summarizing 19 experimental runs (Table 1) was developed to optimize the concentrations of (X_1) soybean meal (0.5 – 2.5%, w/v), (X_2) castorbean meal (0 – 0.5 %, w/v), (X_3) glycerol-AG (0 – 6 %, v/v) and (X_4) KH_2PO_4 (0.1 – 0.6 %, w/v), which were evaluated as the variables to optimize lipase production by *B. ribis* EC-01. The nutrient medium consisted of distilled water and the variables (X_1 - X_4) according to the experimental design shown in Table 1. A second factorial design with 11 runs (2^2 , plus 4 star points, and 3 central points; *treatment 2*) was developed and was based upon the results obtained from treatment 1, and is shown in Table 2. The factors studied included the concentration of (X_5) soybean meal (0.7 – 3.3 %, w/v) and (X_6) glycerol-AG (1.0 – 8.0 %, v/v).

The experimental results of the factorial designs were fitted with a polynomial equation (1) by a multiple regression technique, where Y is the predicted response (lipase activity), β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} are constant coefficients, and x_i , x_j are the coded independent factors (10).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=j}^k \beta_{ii} x_i x_j + \sum_{i<j}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

The linear (equation 2) and quadratic (equations 3, 4 and 5) polynomials were fitted to correlate the relationship between the variables and the response. The optimum conditions were predicted using the quadratic equations. Regression coefficients (R^2) were used to express quality of the fit of the polynomial models, and its statistical significance was determined by the F -test. Analysis of variance (ANOVA) and multiple regression analysis were performed at the level of 5 % significance using STATISTICA Version 8.0.

Lipase immobilization onto Celite

Celite (0.5 g) was incubated with 10 mL of a *B. ribis*EC-01 lipase solution (10.4 U/mL in 0.05 M phosphate buffer, pH 8.0) at 5 and 25 °C and stirred at 200 rpm. After 1 h the immobilized lipases at the two temperatures were recovered by filtration, washed twice with 10 mL of phosphate buffer (pH 8) followed by water, and dried under vacuum overnight. The amount of lipase immobilized on Celite was calculated from the concentration of the protein and activity in the reaction solution before and after immobilization as the activity in the immobilized lipase.

Analytical methods

Protein was determined according to Bradford using bovine albumin as the standard(3).

Determination of lipase activity

Free and immobilized lipase activity was determined using *p*-nitrophenyl-palmitate (*p*NP-P) as substrate. The reaction was carried out in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) at 55 °C for 2 min. Absorbance was measured at 410 nm (coefficient of molar extinction for *p*-nitrophenol (*p*NP) was 1.5×10^4 /M/cm)(16). For immobilized lipase activity determinations, 1 mg of immobilized enzyme was used. The unit of lipase activity is defined as the release of 1 μ mol of *p*NP per min of enzyme solution under the assay conditions.

Determination of immobilized lipase activity at different pH and temperature

The activity of immobilized lipase was determined at different pH (1-10) and temperatures (30-65 °C) following procedures describe above.

Determination of thermal stability of immobilized lipase

The lipaseimmobilized onto Celite was incubated at the following temperatures: 40, 45, 50, 55°Cfor96 h. Theresiduallipaseactivitywas assayedunder standard conditions.

Determination of stability of immobilized lipase in solvents

Stabilityin organic solvents was evaluatedby incubating50mg ofimmobilized lipase onto Celite in hexane (99.3 %, v /v),glycerol (50.0 %, v /v),ethanol, methanol and*tert*-butanol (10, 25, 50 and 99.3 %, v /v) at 25 °C for1 h at200rpm. Theresiduallipaseactivitywas assayedunder standard conditions.

Kinetics analysis

The Michaelis-Menten constant (K_m) and maximumvelocity(V_{max})of the enzymeimmobilized onCelite was calculated by theMichaelis-Menten and Lineweaver-Burk plots usingGraphPad Prismv.5.03for Windows,GraphPadSoftware, Inc.The immobilized enzymewas assayed

under standard conditions with *p*NP-esters (acetate, butyrate, caproate, caprate, palmitate and stearate) at concentrations that ranged from 0.1 to 12 mM using 1 mg of immobilized lipase.

Production of biodiesel with immobilized lipase

The transesterification reactions using immobilized lipase were performed in Erlenmeyer flasks under continuous agitation and at controlled temperature. The reaction mixture using *B. ribis* EC-01 lipase immobilized onto Celite consisted of soybean oil (5 g), water (2.5 – 7.5 % based on soybean oil weight), methanol (molar ratios of oil-to-alcohol of 1:3; 1:4.5 and 1:6), *tert*-butanol (10 – 30 % of soybean oil weight), and immobilized lipase (100 mg with 14.9 U of total lipase activity). The mixtures were maintained under agitation (200 rpm) at 45 °C for 96 h. Afterwards the products were taken from the reaction and centrifuged at 15,000 rpm for 15 min. The resulting upper layer containing the fatty acid methyl esters (FAME) was diluted in *n*-heptane and analyzed by GC.

Biodiesel analysis

Fatty acid methyl esters (FAME) were analyzed on a Gas Chromatograph Trace GC Ultra (Thermo Scientific, USA) equipped with a capillary column DB-1 100 % siloxane (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm; J & W Scientific, USA). The column temperature was heated to 120 °C (30 s) and 220 °C (1 min) at a heating rate of 30 °C/min, and then increased to 250 °C (10 °C/min) and maintained for 5 min. The temperatures of the split injector and FID detector were set at 260 and 280 °C, respectively. Methyl heptadecanoate was used as standard.

Results and discussion

Lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01

A comparison of lipase production by *B. ribis* EC-01 cultivated separately on castorbean, soybean, and corn kernel meals as substrates by SmF was described by Barbosa et al. (2). In this study, soybean meal promoted highest lipase titres without the need to add nutrients to the medium (only distilled water) in comparison to the other residues. A comparison of the concentration effect of this meal was made and revealed that 1 % (w/v) promoted best results. They also showed that KH_2PO_4 positively influenced lipase production.

The effect of castorbean and soybean meals, separately and in combination, was evaluated as fermentation substrates for lipase production by *B. ribis* EC-01 at 1 % (w/v) final concentration using only distilled water and no added nutrients or salts, such as VMSM. The lipase titres obtained on 1 % (w/v) soybean meal was 13.4 ± 0.6 U/mL (or $1,179 \pm 52.8$ U/g based on the dry solids content, ds), and with 1 % (w/v) castorbean meal, 12.3 ± 0.4 U/mL ($1,094 \pm 124.5$ U/g ds). When the meals were used in combination in the ratio of 1:1 (0.5 %

w/v) of each meal, respectively, the activity increased to 15.8 ± 1.2 U/mL ($1,398 \pm 106.2$ U/g ds). At a ratio of 1:3 (0.25 % w/v soybean meal and 0.75% w/v castorbean meal), lipase titres decreased to 10.3 ± 1.7 U/mL (913.4 ± 150.8 U/g ds), while at 3:1 (0.75 % w/v soybean meal and 0.25 % w/v castorbean meal), lipase titres increased to 18.3 ± 0.2 U/mL ($1,614 \pm 17.6$ U/g ds). Consequently, both meals were selected as the two variable parameters that influenced the production of lipase by *B. ribis* EC-01. The findings of this study lend further support that high lipase titres can be produced from plant oil-seed meals, such as soybean and castorbean, by SmF using only water and no additional nutrient supplements.

The influence of glycerol-AG (pure) and crude glycerol-CG (industrial by-product from biodiesel) on lipase production were compared by adding increasing amounts of the two glycerols (2 and 4 % v/v) to the combination of soybean and castor meal at a 3:1 ratio. The addition of glycerol-AG increased the production of lipase by 29 and 87 %, respectively, over cultures not supplemented with glycerol. On the otherhand, when glycerol-CG was added to the meals under similar conditions, lipase titres decreased by 14.8 and 69.4 %, respectively. FT-IR spectroscopy analysis of glycerol-CG (KBr disc) showed evidence of impurities that most likely was responsible for the decreased lipase production, or the lipase activity was inhibited to some extent. Commercial biodiesel production from soybean oil involves a homogeneous alkaline catalyst (NaOH) and an alcohol (methanol), and in the reaction sodium methoxide is formed which esterifies the liberated free fatty acids (FFA). Sulfuric acid is used to neutralise the reaction, and glycerol is a by-product that can be contaminated with the reactants and products formed. The final chemical composition of the glycerol-CG depends upon the type of catalyst used to produce biodiesel, the transesterification efficiency, other impurities in the plant seed-oil feedstock, and whether the methanol and catalysts were fully recovered (27). Sodium methoxide was found to be present in glycerol-CG (C-O appears as a doublet at approximately 1070 and 1088 cm^{-1}), and also FFA (C=O in 1700 and C-O 1300 cm^{-1} approximately).

Considering that soybean and castorbean meals, KH_2PO_4 (2) as well as glycerol-AG positively affected the production of lipase by *B. ribis* EC-01, a statistical factorial design was developed using the response surface methodology to optimise lipase production.

Optimisation of lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 using RSM.

Treatment 1. The main objective of a 2^4 factorial design was to evaluate the effect of the selected variables on lipase production by *B. ribis* EC-01 measured in U/g ds. Table 1 shows that lipase production ranged from 360.9 to 3,219 U/g ds, depending on the medium composition after 120 h of fermentation. The predictive equation **2** ($R^2 = 0.933$) as a function

was 71.0 U/mL, when the concentration of soybean meal and glycerol-AG were 2.4 % (w/v) and 4.5 % (v/v), respectively.

The model calculated for lipase in specific activity (U/mg protein) was:

$$\frac{U}{mg} = 77.6 - 19.7 X_5 + 1.1 (X_5)^2 - 8.9 X_6 - 4.0 (X_6)^2 - 2.5 (X_5 X_6) \quad (4)$$

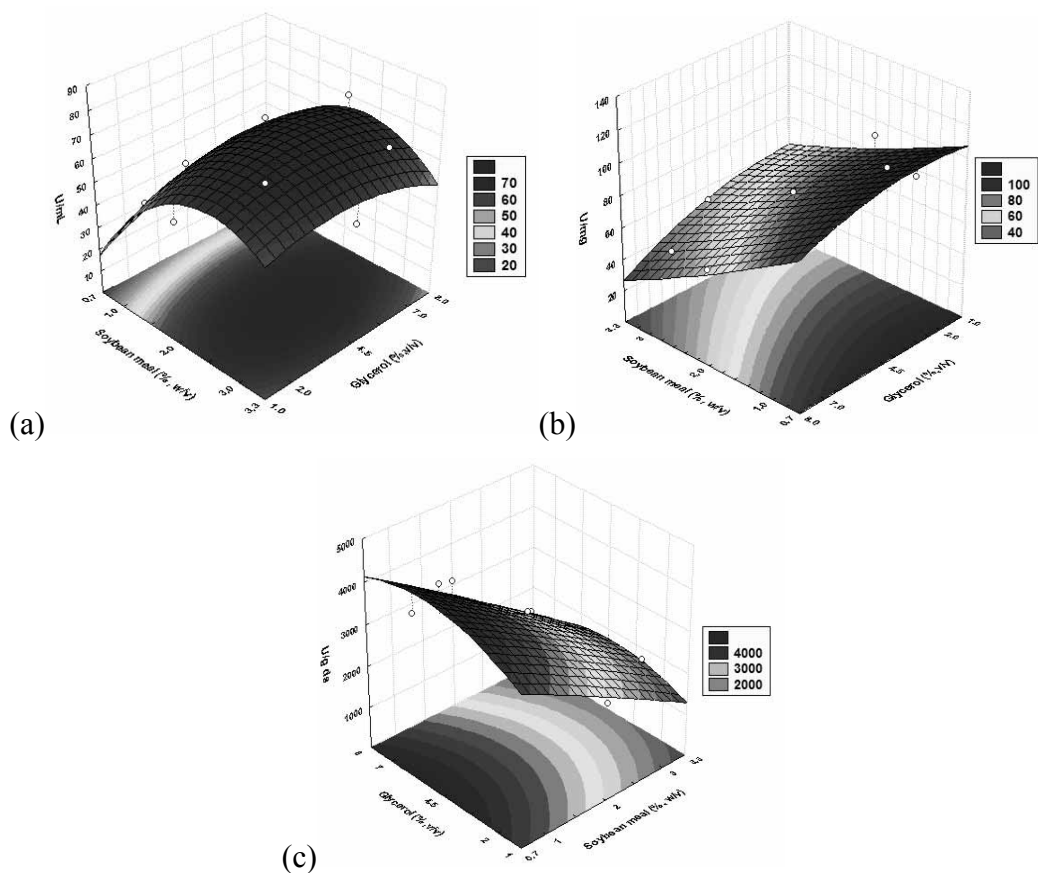
The response surface and the contour plots representing the model deduced from the experimental design are shown in Fig. 2b. It was possible to determine the optimal region for *B. ribis* EC-01 lipase production, and the estimated value by the model was 111.8 U/mg protein by using 0.6% (w/v) soybean meal and 2.8% (v/v) glycerol-AG.

The model for lipase production in U/g ds is described in the equation 5.

$$\frac{U}{g ds} = 3116.2 - 927.9 X_5 - 21.0 (X_5)^2 + 82.7 X_6 - 261.5 (X_6)^2 - 76.3 (X_5 X_6) \quad (5)$$

Fig. 2c shows the surface plot for lipase production, and the highest titer(4,892 U/g ds) was obtained when *B. ribis*EC-01 was grown on 0.5 % (w/v) soybean meal and 5.2 % (v/v) glycerol-AG (estimated values).

Fig. 2



The quadratic models are presented in Table 3 and showed that $F_{calc} > F_{list}$ in the corresponding freedom degrees for lipase production in U/mL, U/mg protein and U/g ds. The

F-value and the three values of the respective coefficients of regression (R^2) suggested that the adjusted models demonstrated good predictive capacity and were statistically valid.

Soybean meal was used by Liu and Zhang(15) as substrate for lipase production by a yeast strain of *Candida antarctica* (DSM-3855) using RSM, and optimal enzyme production (27.34 U/mL) was obtained at pH 6.0, 26 °C and 3.38 % (w/v) soybean meal, in a complex medium containing yeast extract, soybean oil and Tween-80 after 58 h of growth in a 15 L fermenter. Considering that all the experiments with *B. ribis* EC-01 were conducted in shake flasks, there is the potential to increase the production of lipase by this fungus in a fermenter on a larger scale.

Model validation. Experimental validation of the model was performed under the three conditions established: soybean meal and glycerol-AGat concentrations of 2.4 % (w/v), 4.5 % (v/v); 0.6% (w/v), 2.8% (v/v); and 0.5 % (w/v), 5.2 % (v/v); respectively, using distilled water, and no added nutrients. Under the three experimental conditions, the predicted results for lipase production were 71.0 U/mL, 111.8 U/mg protein, and 4,892 U/g ds, respectively (95 % confidence level). The experimentally-observed production of lipase by *B. ribis* EC-01 using the three conditions defined above resulted in lipase activities of 76.6 ± 8.0 U/mL; 138.7 ± 0.4 U/mg; $4,820 \pm 248.8$ U/g ds, which were in good agreement with the predicted values calculated by the model. The validation to improve the lipase production in U/g ds corroborated to an extrapolation of the substrate range to a minimum of 0.5 % (w/v) soybean meal.

The cost of the production of lipase was compared when *B. ribis* EC-01 was grown by SmF on: (i) 1 % (v/v) soybean oil supplemented with VMSM, (ii) 1 % (w/v) soybean meal in only distilled water, and (iii) under two statistically optimized conditions described in this work (Table 4). In considering cost estimates, the cost of enzyme production was based only on nutrient costs and did not include energy. The unitary cost of producing lipase by *B. ribis* EC-01 under SmF was lowest with soybean meal (\$US 0.14) as substrate by comparison to soybean oil (\$US 0.95). The higher cost of lipase production on soybean oil was due to the cost of the soybean oil, and the nutrient supplements added (VMSM). The latter increased costs over distilled water. The addition of glycerol to the soybean meal increased the costs (\$US 0.42 – 0.44), but its addition was compensated by increased lipase titres (1.44- and 4.03-fold increases measured in U/mL; and 2.88- and 1.68- fold when measuring lipase activity as U/g ds) by comparison to soybean meal alone, under the optimized condition determined in the present work (Table 4).

Lipase immobilization onto Celite

The crude lipase produced under optimal conditions (equation 4) was dialyzed against deionized water to ensure that the salts were removed and then lyophilized for 72 h. A solution of this enzyme (10.4 U/mL) was prepared in phosphate buffer for immobilization onto Celite by adsorption at two temperatures (5 and 25 °C). The lipase preparation was successfully immobilized on Celite reaching maximum activity of 149.2 U/g Celite at 5 °C (Table 5). The protein loaded at this temperature was 98.7 % of the total protein offered, and the specific activity reached 40.43 U/mg-protein after a 1-h reaction. The specific activity corresponded to 72.7 % of the free lipase activity. Chang et al. (5), using Response Surface Methodology reported a maximum specific activity of 18.16 U/mg protein for *Candida rugosa* lipase immobilized on Celite when the immobilization was carried out at 10.7 °C over 59.1 min. The comparison of the activities measurements is complicated as different methods were used.

Optimal conditions of pH and temperature activity of immobilized lipase onto Celite

The maximum lipolytic activity of immobilized lipase was achieved at pH 8 with phosphate buffer. The same result was found for the free form of this enzyme. The optimum temperature for immobilized lipase on Celite was 55 °C, again similar to the free lipase. This may mean that the immobilization procedure used did not affect the activation energy of the lipase, thus having the same optimal temperature for the lipolytic activity (14). Furthermore, the immobilized lipase showed higher activity above 55 °C when compared with its free form. The relative activities for immobilized lipase at 60 and 65 °C were 88 and 75 %, respectively, while for free lipase were 64 and 53 %, respectively for these temperatures. Similar results were described by Liu et al. (14) with a lipase from *Burkholderia* immobilized covalently on Celite.

Thermal stability of immobilized lipase onto Celite

The thermal stability of immobilized lipase was investigated at 40 – 55 °C during 96 h. The results showed that the immobilization of *B. ribis* EC-01 lipase on Celite allowed greater stability at 55 °C. After 1 h incubation, the immobilized lipase maintained 92 % of its initial activity retaining at least 80 % by the end of experiment (96 h). Free *B. ribis* EC-01 lipase retained 82 % and 64 % of its initial activity at 55 °C after 1 h and 96 h of incubation, respectively. A similar result for immobilized lipase was found by Liu et al. (14) for *Burkholderia* sp. C20 lipase immobilized covalently on Celite, and during 1 h retained over 90 % of its original activity, but then gradually decreased activity to 83 % after 2 h.

Stability of *Botryosphaeria ribis* EC-01 immobilized lipase in solvents

Some solvents are required in the making of biodiesel were tested in concentrations ranging from 10 to 100 % (v/v) during 1 h. The alcohols tested were methanol and ethanol,

alcohols commonly used in transesterification of plant seed-oils. In the presence of methanol the *B. ribis* EC-01 immobilized lipase showed high stability up to 25 % (v/v) with a residual activity of 86 %, decreasing to 55 and 40 % in presence of 50 and 100 % (v/v) of alcohol, respectively. Ethanol did not provide good stability to the immobilized lipase and at 10 % concentration, the residual activity was 48 %. Although the immobilized lipase showed good stability at all concentrations of *tert*-butanol tested, a minimum of 76 % of its initial activity was retained. *Tert*-butanol is an important co-solvent for transesterification reactions to produce biodiesel which could eliminate the negative effect from the insoluble methanol and glycerol (9). Hexane was tested at 100 % (v/v) concentration and increased the immobilized lipase activity to 102 % after a 1 h incubation. The immobilized lipase preparation was also stable in 50 % of glycerol retaining total activity.

Kinetics analysis

Kinetics properties of the immobilized lipase were investigated varying the concentration of *p*NP esters (0 to 12 mM) as substrates in Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk plots. The apparent K_m value decreased as the carbon chain increased, showing higher affinity for *p*NPP with a K_m apparent and V_{max} respectively of 1.86 mM and 50.59 U/g support (corresponding to 14.29 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$). The free lipase preparation exhibited K_m and V_{max} , respectively, of 0.37 mM and 106.8 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ (corresponding to 24.25 U/mL). The increase in K_m value suggests conformational changes in the enzyme during immobilization, or were due to the lower accessibility of the substrate to the active sites of the immobilized enzyme. The obstruction of enzyme-substrate interaction may be due to the partition effect between support and substrate (6, 11).

Production of biodiesel using immobilized *Botryosphaeria ribis* EC-01 lipase produced under the optimized conditions developed

The transesterification of soybean oil at different concentrations of water, *tert*-butanol as co-solvent, and ratio of oil/alcohol was investigated using the immobilized lipase preparation from *B. ribis* EC-01 to evaluate the reaction conditions for producing biodiesel (FAME). The immobilized lipase on Celite reached a conversion to FAME of 36.3 % in 96 h using soybean oil/methanol of 1:3, 2.5 % and 10 % (weight of oil) of water and *tert*-butanol, respectively, at 45 °C and 200 rpm. Biodiesel production using free *B. ribis* EC-01 lipase (oil/methanol of 1:5) resulted in a maximum FAME of 6 %. The increase in FAME production using immobilized lipase is very promising, since this lipase preparation was produced on an agro-industrial waste residue, and the enzyme was not purified. Further

studies are in progress on the optimization using statistical design to enhance the conversion efficiency of soybean oil to FAME. Sha and Gupta (21) also used Celite as support to immobilize a commercial lipase to produce biodiesel from Jatropha oil and obtained 80 % conversion to biodiesel.

Conclusion

The present work demonstrated that *B. ribis* EC-01 was able to produce lipase by SmF when grown on soybean and castorbean meals as sources of fermentation substrates in distilled water, without the need to add nutrients. When both substrates were combined, however, castorbean meal was found not to be statistically significant in increasing lipase production, while the soybean meal concentration was the variable most influencing lipase production in terms of enzyme titers. Optimization by factorial design and RSM contributed to a 4-fold increase in the production of lipase by *B. ribis* EC-01; from $1,240 \pm 272.4$ U/gds in the initial culture condition to $4,820 \pm 248.8$ U/g ds under the optimized condition developed by the model. To the author's knowledge, the lipase titer obtained is the highest yet reported for a microbial lipase. The impurities in the crude glycerol-CG, a by-product from biodiesel production, decreased lipase production, while pure glycerol-AG positively influenced the production of lipase by *B. ribis* EC-01. The cost of enzyme production was compared under the optimized conditions developed. The addition of glycerol as nutrient supplement to the culture medium with soybean meal increased lipase production costs, but this nutrient supplement also increased lipase titers under the optimized conditions established. The immobilization of *B. ribis* EC-01 lipase on Celite proved satisfactory resulting in a stable immobilized enzyme preparation with high activity. The immobilized lipase was able to catalyze the transesterification of soybean oil to fatty acyl methyl esters (FAME) improving the conversion from 6 to 36 % of biodiesel using immobilized lipase.

Acknowledgements The authors gratefully acknowledge Fundação Araucária, PR – Brazil (PROT. 15285 - Cham. Project: 14/2008); PROPPG-UEL–Londrina-PR, Brazil (Project: 06246), for financial support. M.M. Andrade is grateful to CAPES for a doctoral scholarship, M.R. Bofinger to CNPq (PIBIC-IC) and T.Zaminelli to Fundação Araucária for their respective scholarships. B.H. Oliveira and V.M.G. Lima thanks FAPESP Brazil (PROT. 2010/07998-9) for a visiting fellowship to the Biorefining Research Institute.

References

1. Balcão, V. M., Paiva, A. L. and Xavier Malcata, F. (1996) Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, *18*, 392-416.
2. Barbosa, A. M., Messias, J. M., Andrade, M. M., Dekker, R. F. H. and Venkatesagowda, B. (2011), in Soybean - Biochemistry, Chemistry and Physiology, InTech, pp. 101-118.
3. Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* *72*, 248-254.
4. Brisson, D., Vohl, M. C., St-Pierre, J., Hudson, T. J. and Gaudet, D. (2001) Glycerol: a neglected variable in metabolic processes? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, *23*, 534-542.
5. Chang, S.-F., Chang, S.-W., Yen, Y.-H. and Shieh, C.-J. (2007) Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on Celite by RSM. *Applied Clay Science*, *37*, 67-73.
6. Chiou, S.-H. and Wu, W.-T. (2004) Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*, *25*, 197-204.
7. Galvagno, M. A., Iannone, L. J., Bianchi, J., Kronberg, F., Rost, E., Carstens, M. R. and Cerrutti, P. (2011) Optimization of biomass production of a mutant of *Yarrowia lipolytica* with an increased lipase activity using raw glycerol. *Revista Argentina de Microbiologia*, *43*, 218-225.
8. Gupta, N., Mehra, G. and Gupta, R. (2004) A glycerol-inducible thermostable lipase from *Bacillus* sp.: medium optimization by a Plackett-Burman design and by response surface methodology. *Canadian journal of microbiology*, *50*, 361-368.
9. Halim, S. F. A. and Harun Kamaruddin, A. (2008) Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a tert-butanol system. *Process Biochemistry*, *43*, 1436-1439.
10. He, Y.-Q. and Tan, T.-W. (2006) Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. 99-125. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *43*, 9-14.
11. Kanwar, L. and Goswami, P. (2002) Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its application in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilised lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, *31*, 727-735.
12. Lin, E.-S., Wang, C.-C. and Sung, S.-C. (2006) Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*, 98-102.
13. Liu, C.-H., Huang, C.-C., Wang, Y.-W., Lee, D.-J. and Chang, J.-S. (2012) Biodiesel production by enzymatic transesterification catalyzed by *Burkholderia* lipase immobilized on hydrophobic magnetic particles. *Applied Energy*, *100*, 41-46.
14. Liu, C.-H., Lin, Y.-H., Chen, C.-Y. and Chang, J.-S. (2009) Characterization of *Burkholderia* lipase immobilized on celite carriers. *Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineering*, *40*, 359-363.
15. Liu, J. and Zhang, Y. (2011) Optimisation of lipase production by a mutant of *Candida antarctica* DSM-3855 using response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, *46*, 695-701.
16. Messias, J. M., da Costa, B. Z., de Lima, V. M. G., Dekker, R. F. H., Rezende, M. I., Krieger, N. and Barbosa, A. M. (2009) Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*, *45*, 426-431.

17. Monier, M., El-Sokkary, A. M. A. and Sarhan, A. A. (2010) Immobilization of *Candida rugosa* lipase on modified natural wool fibers. *Reactive and Functional Polymers*, *70*, 122-128.
18. Pandey, A. (2003) Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *13*, 81-84.
19. Petkar, M., Lali, A., Caimi, P. and Daminati, M. (2006) Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *39*, 83-90.
20. Ramachandran, S., Singh, S. K., Larroche, C., Soccol, C. R. and Pandey, A. (2007) Oil cakes and their biotechnological applications – A review. *Bioresource Technology*, *98*, 2000-2009.
21. Shah, S. and Gupta, M. N. (2007) Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system. *Process Biochemistry*, *42*, 409-414.
22. Sharma, D., Sharma, B. and Shukla, A. K. (2011) Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A Review. *Biotechnology*, *10*, 23-40.
23. Szczesna Antczak, M., Kubiak, A., Antczak, T. and Bielecki, S. (2009) Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy*, *34*, 1185-1194.
24. U.S.D.A. (2011) Economic Research Service, World Agricultural Supply and Demand Estimates. *WASDE-493*, pp. 1-39.
25. Villeneuve, P., Muderhwa, J. M., Graille, J. and Haas, M. J. (2000) Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *9*, 113-148.
26. Vogel, H. J. (1956) A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Microbial Genetics Bulletin*, *13*.
27. Yang, F., Hanna, M. and Sun, R. (2012) Value-added uses for crude glycerol--a byproduct of biodiesel production. *Biotechnol Biofuels*, *5*, 1-10.

Figure captions

Figure 1 Response surface plot of lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01-treatment 1 (activity in U/g ds)

Figure 2 Response surface of lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01-treatment 2. Lipase activity expressed as (a) U/mL; (b) U/mg protein and (c) U/g ds

Table 1. Factorial design to evaluate the effects of soybean meal, castorbean meal, glycerol-AG, and phosphate on lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01, and the responses (lipase activities) obtained.

| Run N° | Coded variables | | | | Responses | | |
|---|-----------------|----------------|----------------|----------------|-----------|-------|--------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ | X ₄ | U/mL | U/mg | U/g ds |
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 8.0 | 183.6 | 1,413 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | -1 | 16.9 | 59.8 | 593.6 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | -1 | 20.9 | 98.7 | 1,844 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | -1 | 42.4 | 117.4 | 1,247 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | -1 | 18.3 | 103.0 | 3,219 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | -1 | 67.3 | 284.1 | 2,367 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | -1 | 30.1 | 105.3 | 2,665 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | -1 | 92.6 | 365.4 | 2,720 |
| 9 | -1 | -1 | -1 | 1 | 2.1 | 43.4 | 360.9 |
| 10 | 1 | -1 | -1 | 1 | 45.7 | 148.3 | 1,607 |
| 11 | -1 | 1 | -1 | 1 | 8.3 | 52.1 | 737.2 |
| 12 | 1 | 1 | -1 | 1 | 59.7 | 211.6 | 1,753 |
| 13 | -1 | -1 | 1 | 1 | 3.0 | 95.3 | 532.9 |
| 14 | 1 | -1 | 1 | 1 | 48.2 | 234.6 | 1,696 |
| 15 | -1 | 1 | 1 | 1 | 7.0 | 35.8 | 619.2 |
| 16 | 1 | 1 | 1 | 1 | 23.4 | 89.0 | 688.5 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 28.8 | 136.1 | 1,449 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 32.0 | 153.5 | 1,609 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23.9 | 114.4 | 1,204 |
| Factors | Real levels | | | | | | |
| | -1 | 0 | 1 | | | | |
| X ₁ (soybean meal, % w/v) | 0.5 | 1.5 | 2.5 | | | | |
| X ₂ (castorbean meal, % w/v) | 0.0 | 0.25 | 0.5 | | | | |
| X ₃ (glycerol-AG*, % v/v) | 0.0 | 3.0 | 6.0 | | | | |
| X ₄ (phosphate, % w/v) | 0.1 | 0.35 | 0.6 | | | | |

* Analytical grade glycerol

Table 2. Central composite design matrix to evaluate the effects of soybean meal and glycerol-AG on lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 and the responses (lipase activities) obtained.

| Run N° | Codedvariables | | Responses | | |
|--------------------------------------|----------------|----------------|-----------|-------|--------|
| | X ₅ | X ₆ | U/mL | U/mg | U/g ds |
| 1 | -1 | -1 | 40.9 | 89.2 | 3,334 |
| 2 | -1 | 1 | 40.3 | 80.2 | 3,287 |
| 3 | 1 | -1 | 76.7 | 63.5 | 2,312 |
| 4 | 1 | 1 | 65.0 | 44.5 | 1,960 |
| 5 | 0 | 0 | 77.1 | 81.4 | 3,394 |
| 6 | 0 | 0 | 68.3 | 70.6 | 3,004 |
| 7 | 0 | 0 | 67.0 | 80.7 | 2,948 |
| 8 | -1.41 | 0 | 39.6 | 119.4 | 4,977 |
| 9 | 1.41 | 0 | 52.3 | 51.2 | 1,394 |
| 10 | 0 | -1.41 | 53.0 | 90.3 | 2,332 |
| 11 | 0 | 1.41 | 70.1 | 60.0 | 3,083 |
| Factors | Real levels | | | | |
| | -1.41 | -1 | 0 | +1 | +1.41 |
| X ₅ (soybean meal, % w/v) | 0.7 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 3.3 |
| X ₆ (glycerol-AG*, % v/v) | 1.0 | 2.0 | 4.5 | 7.0 | 8.0 |

* Analytical grade glycerol

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for second order 2^2 factorial design for the production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 ($p \leq 0.05$).

| Response (lipase activity) | Source of variation | Sum Square (SS) | Degrees of freedom (DF) | Mean square (MS) | <i>F</i> test | |
|----------------------------------|------------------------|--------------------|-------------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | | | | <i>F</i> _{calc} | <i>F</i> _{list} |
| U/mL ^a | Model | 1623.5 | 2 | 811.8 | 14.1 | 4.46 ^b |
| | Residual | 461.5 | 8 | 57.7 | | |
| | Total | 2085.0 | 10 | | | |
| U/mg ^c | Model | 3879.4 | 1 | 3879.4 | 71.0 | 5.12 ^d |
| | Residual | 491.6 | 9 | 54.6 | | |
| | Total | 4371.0 | 10 | | | |
| U/g ds ^e | Model | 7346781 | 1 | 7346781 | 46.7 | 5.12 ^f |
| | Residual | 1414502 | 9 | 157166.9 | | |
| | Total | 8761283 | 10 | | | |

^a $R^2 = 0.779$; ^b $F 95\%.2.8$; ^c $R^2 = 0.888$; ^d $F 95\%.1.9$; ^e $R^2 = 0.839$; ^f $F 95\%.1.9$

Table 4. Comparison of lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 in SmF, and the unitary cost (\$US) of producing lipase from four different nutrient media.

| Medium composition | Lipase titers | | Lipase cost ^a (\$US) | Reference |
|--|-------------------|--------------------|------------------------------------|-------------------|
| | (U/mL) | (U/g ds) | | |
| Soybean oil (1% v/v in VMSM ^b) | 34.7 | - | 0.95 | (16) ^c |
| Soybean meal (1% w/v in water ^d) | 13.4 | 1,709 | 0.14 | this work |
| Soybean meal (0.5 % w/v) + Glycerol-AG ^e (5.2 % v/v) in water | 27.4 | 4,820 ^f | 0.44 | this work |
| Soybean meal (2.4 % w/v) + Glycerol-AG (4.5 % v/v) in water | 76.6 ^g | 2,809 | 0.42 | this work |

^a based on nutrient costs per liter of medium, and where relevant, includes the costs of soybean oil, soybean meal, glycerol, VMSM and distilled water, but excludes energy costs; ^b VMSM (Vogel minimum salts medium); ^c taken from Table 2; ^d distilled water; ^e glycerol analytical grade; ^f lipase in U/g ds as optimized by the statistical model (*treatment 2*); ^g lipase in U/mL as optimized by the statistical model (*treatment 2*).

Table 5. Yields of protein and activity of immobilized *Botryosphaeria lipase* EC-01 on Celite

| Immobilization temperature (°C) | Protein loading (mg/g-celite or mL lipase solution) | Protein loading yield (%) | Lipase activity (U/g-celite or mL lipase solution) | Specific activity (U/mg-protein) |
|---------------------------------|---|---------------------------|--|----------------------------------|
| 5 | 3.69 | 98.7 | 149.2 | 40.43 |
| 25 | 3.54 | 94.7 | 109.4 | 30.90 |
| Free lipase | 0.187 ^a | - | 10.40 | 55.61 |

^a protein content on lipase solution

^b activity of lipase solution