

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE AGRONOMIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PABLINE RAFAELLA MELLO BUENO

**ISOLAMENTO, SELEÇÃO E CULTIVO DE BACTÉRIAS  
PRODUTORAS DE LIPASES PARA TRATAMENTO DE  
EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

GOIÂNIA  
2012

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       **Dissertação**       **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor (a):	Pabline Rafaella Mello Bueno		
E-mail:	pablinemello@yahoo.com.br		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor:	-		
Agência de fomento:	Universidade Federal de Goiás	Sigla:	UFG
País:	Brasil	UF:	GO
		CNPJ:	01567601/0001-43
Título:	Isolamento, seleção e cultivo de bactérias produtoras de lipases para tratamento de efluentes da indústria de alimentos		
Palavras-chave:	hidrólise, tributirina, fermentação		
Título em outra língua:	Isolation, selection and growth of bacteria producing lipase wastewater treatment for food industry		
Palavras-chave em outra língua:	hydrolysis, tributyrin, fermentation		
Área de concentração:	Ciência de Alimentos		
Data defesa:	12/03/2012		
Programa de Pós-Graduação:	Ciência e Tecnologia de Alimentos		
Orientador (a):	Manoel Soares Soares Júnior		
E-mail:	mssoaresjr@hotmail.com		
Co-orientador:*	Gabriel Luis Castiglioni		
E-mail:	g_castigli@yahoo.com.br		

\*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Pabline Rafaella Mello Bueno  
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 10/04/2012

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

PABLINE RAFAELLA MELLO BUENO

**ISOLAMENTO, SELEÇÃO E CULTIVO DE BACTÉRIAS  
PRODUTORAS DE LIPASES PARA TRATAMENTO DE  
EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás, como exigência para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**Orientador:** Prof. Dr. Manoel Soares Soares Júnior.

**Co-Orientadores:** Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni.  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Raquel Hidalgo Campos.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
GPT/BC/UFG**

B928i Bueno, Pabline Rafaella Mello.  
Isolamento, seleção e cultivo de bactérias produtoras de lipases para tratamento de efluentes da indústria de alimentos [manuscrito] / Pabline Rafaella Mello Bueno. – 2012.  
100 f.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Soares Soares Junior;  
Coorientador: Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.  
Maria Raquel Hidalgo Campos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, 2012.

Bibliografia.

Apêndices.

1. Bactérias – Isolamento – Cultivo. 2. Lipases. I. Título.

CDU: 631.461.7

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE AGRONOMIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PABLINE RAFAELLA MELLO BUENO


**ISOLAMENTO, SELEÇÃO E CULTIVO DE BACTÉRIAS  
PRODUTORAS DE LIPASES PARA TRATAMENTO DE  
EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

Dissertação defendida e aprovada em 12 de março de 2012, pela Banca  
Examinadora constituída pelos membros:



---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Fabrícia Paula de Faria  
ICB/UFG



---

Prof. Dr. Márcio Caliari  
EA/UFG



---

Prof. Dr. Manoel Soares Soares Júnior  
Orientador - EA/UFG

## DEDICATÓRIA

À Deus, em Cristo Jesus, “porque Dele, por meio Dele, e para Ele são todas as coisas. A Ele, pois, a glória eternamente” (Romanos 11.36). E também aos meus pais, Abadia e Sidemar, e ao meu noivo, Danilo, pelo amor e incentivo. Amo muito todos vocês!!

## AGRADECIMENTOS

À Deus – Jesus – pois toda minha vida está nas mãos dEle (Ap. 5.5) e se até aqui cheguei foi pela Sua soberana e graciosa vontade.

Aos meus pais e irmão, pelo amor, apoio e compreensão ao longo desses dois anos, possibilitando o alcance de mais esse objetivo.

Ao meu noivo, Danilo, pelo amor, carinho, ajuda, compreensão e palavras de incentivo e ânimo, tanto nos momentos de alegrias quanto nos de tristezas. Faltam-me palavras para agradecer...

Ao meu orientador, prof. Dr. Manoel Soares Soares Júnior, pela orientação, dedicação, conselhos, ensinamentos, atenção despendida e pelo grande ensinamento científico.

Ao meu co-orientador, prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni, pela dedicação, ensinamentos, atenção despendida e pelo grande ensinamento científico, que também se portou como orientador, dedicando várias horas no desenvolvimento deste trabalho.

À co-orientadora prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Raquel Hidalgo Campos, pela alegria, exemplo profissional e sugestões que muito contribuíram para este trabalho.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Fabrícia de Paula Faria e ao prof. Dr. Márcio Caliari por aceitarem fazer parte da banca examinadora e cujas correções e sugestões contribuirão para melhoria deste trabalho.

Ao prof. Dr. Cirano, mestrando Fabyano e graduando João Paulo, do Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Goiás, por terem gentilmente cedido espaço para a realização de grande parte deste trabalho, disponibilizando os equipamentos do laboratório, e principalmente, por toda a paciência e ajuda despendida durante os experimentos.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Kátia Flávia e doutoranda Karla, do Laboratório de Química de Proteínas da Universidade Federal de Goiás, por abrirem espaço para esclarecimento de dúvidas e pela análise de eletroforese.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Fabrícia, do Laboratório de Biotecnologia de Fungos da Universidade Federal de Goiás, pela disponibilização da estufa bacteriológica sempre que necessário.

Ao Laboratório de Tratamento de Águas Residuárias e Processos Fermentativos da Universidade Estadual de Campinas e à Fundação Tropical André Tosello, pelos microrganismos cedidos, sem os quais não seria possível a concretização de parte deste trabalho.

À Alessandra, da indústria Micos Cicopal Ltda., por todas as informações concedidas e pela disposição em ajudar.

À indústria Micos Cicopal Ltda., pela parceria na realização deste trabalho, cedendo o efluente industrial sempre que necessário.

À Estação de Tratamento de Esgoto de Goiânia, pelos efluentes cedidos, essenciais para a etapa de isolamento de microrganismos deste trabalho.

Ao mecânico Jorge, do setor de mecânica da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, que elaborou um suporte indispensável para prosseguimento da minha pesquisa.

Aos técnicos, Daives e Ana Paula, da Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás, pela disposição sempre presente em ajudar e pelas longas conversas durante a organização do laboratório.

À D. Antônia, pela paciência e conversas nos corredores do departamento de Engenharia de Alimentos.

A todos do departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás que de alguma forma contribuíram com o presente trabalho.

À Universidade Federal de Goiás, por mais uma vez possibilitar meu desenvolvimento profissional e pessoal e pela bolsa de mestrado.

Enfim, agradeço a todos que fizeram parte de mais esta etapa da minha vida, sejam pelos conselhos, ensinamentos, ajudas, risos, broncas, lágrimas, companheirismo.... Muito obrigada!!



## EPÍGRAFE

“Em Jesus estão escondidos todos os tesouros da sabedoria e do conhecimento.”

Paulo de Tarso aos colossenses.

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo isolar, selecionar e cultivar microrganismos produtores de lipases para aplicar no tratamento de efluente de indústria de batata frita. Para o isolamento de microrganismos foi utilizado efluente industrial e de Estação de Tratamento de Esgotos. A seleção da cepa produtora de lipase foi realizada em meio sólido, contendo tributirina e em meio líquido, com par-nitrofenolpalmitato. A otimização da produção de lipase foi realizada tendo como variáveis, a concentração de água de maceração de milho, óleo de soja e diferentes fontes minerais. O extrato enzimático e a enzima comercial da cepa selecionada foram caracterizados acerca da atividade ótima e estabilidade em diferentes temperaturas e pHs e determinada a massa molecular da enzima comercial. Para o tratamento do efluente, o mesmo foi caracterizado e realizou-se otimização da hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente, tendo como variáveis, o pH, concentração de enzima, agente emulsificante e a influência dos processos descontínuo e descontínuo alimentado. Foram isolados vinte e nove microrganismos e onze foram adquiridos de institutos de pesquisa. Destes, quatro microrganismos foram pré-selecionados por apresentarem maior atividade enzimática. Na seleção em fermentação submersa, a melhor atividade enzimática foi da cepa *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. A otimização da produção de lipase foi obtida utilizando-se água de maceração de milho (13,8 a 26,2 g.L<sup>-1</sup>) e nitrato de sódio (1,5 a 3,9 g.L<sup>-1</sup>). Na caracterização das lipases do extrato enzimático e da lipase comercial de *Burkholderia cepacia*, os melhores resultados foram encontrados a 37°C e pH 8,0. Foram estáveis a 40°C, e termossensíveis a 50 e 60°C. A inativação das lipases seguiu modelo de desnaturação de primeira ordem. A massa molecular da enzima comercial foi de 33 kDa. Para o tratamento do efluente, a atividade hidrolítica máxima (0,310 U.mL<sup>-1</sup>) foi observada quando o volume de goma arábica a 7% foi fixado em 3 mL, entre o pH de 7,47 a 7,92 e concentração de enzima de 0,111 a 0,148 g.mL<sup>-1</sup>. O modelo matemático obtido pode ser utilizado para fins preditivos e o processo descontínuo possibilitou maior hidrólise dos triacilglicerídeos presentes no efluente.

Palavras-chave: hidrólise, tributirina, fermentação.

## ISOLATION, SELECTION AND GROWTH OF BACTERIA PRODUCING LIPASE WASTEWATER TREATMENT FOR FOOD INDUSTRY

### ABSTRACT

The present work was to isolate, select and cultivate microorganisms that produce lipases to apply the wastewater treatment industry of potato chips. For the isolation of microorganisms was used for industrial effluent and sewage treatment plant. The selection of the strain producing lipase was performed on solid medium containing tributyrin and in liquid medium, with p-nitrofenolpalmitato. Optimization of lipase production was performed as variables, the concentration of corn steep liquor, soybean oil and different mineral sources. The enzyme extract and the commercial enzyme selected strain were characterized on the optimal activity and stability at different temperatures and pH values and determined the molecular weight of the commercial enzyme. For the treatment of sewage, it has been characterized and has been the optimization of hydrolysis of triglycerides of the effluent having as variables, pH, enzyme concentration, emulsifier and the influence of fed batch and batch processes. Twenty-nine were isolated microorganisms were acquired and eleven research institutes. Of these, four microorganisms were pre-selected for their higher enzymatic activity. In the selection in submerged fermentation, enzymatic activity was the best strain of *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. Optimization of lipase production was obtained with corn steep liquor (13.8 to 26.2 g.L<sup>-1</sup>) and sodium nitrate (1.5 to 3.9 g.L<sup>-1</sup>). In the characterization of the lipase enzyme extract and immobilized lipase from *Burkholderia cepacia*, the best results were found at 37°C and pH 8.0. Were stable at 40°C, and thermosensitive at 50 and 60°C. The inactivation of lipases template denaturation followed first order. The molecular mass of commercial enzyme was 33 kDa. For the treatment of effluent, the maximum hydrolytic activity (0.310 U.mL<sup>-1</sup>) was observed when the volume of 7% gum arabic was set at 3 mL of pH between 7.47 to 7.92 and the concentration of enzyme 0.111 to 0.148 g.mL<sup>-1</sup>. The mathematical model obtained can be used for batch process and the predictive largest possible hydrolysis of the triglycerides present in the effluent.

Keywords: hydrolysis, tributyrin, fermentation.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Classificação enzimática conforme a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.....	5
<b>Tabela 2.</b>	Características cinéticas de lipases de origem microbiana.....	11
<b>Tabela 3.</b>	Aplicações industriais das lipases.....	16
<b>Tabela 4.</b>	Matriz codificada para verificar a produção de lipase com diferentes nutrientes adicionados ao meio.....	25
<b>Tabela 5.</b>	Níveis de variação utilizados para verificar a produção de lipase com diferentes nutrientes adicionados ao meio.....	25
<b>Tabela 6.</b>	Matriz codificada do delineamento para a produção de lipase com variação dos teores de água de maceração de milho (AMM) e nitrato de sódio (NaNO <sub>3</sub> ).....	26
<b>Tabela 7.</b>	Níveis codificados e reais de variação de água de maceração de milho e nitrato de sódio, utilizados para a produção de lipase no delineamento experimental.....	26
<b>Tabela 8.</b>	Matriz codificada do delineamento para verificar o grau de hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente industrial em função do pH, da concentração de enzima ([E]) e do volume de goma arábica a 7% (GA 7%).....	32
<b>Tabela 9.</b>	Níveis codificados e reais de variação do pH, concentração de enzima e volume de goma arábica a 7%, utilizados para verificar o grau de hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente industrial.....	32
<b>Tabela 10.</b>	Matriz codificada do delineamento para otimização do grau de hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente industrial em função do pH, da concentração de enzima ([E]) e do volume de goma arábica a 7% (GA 7%).....	33
<b>Tabela 11.</b>	Níveis de variação utilizados no delineamento fatorial completo 2 <sup>3</sup> com quadruplicata no ponto central mais os pontos axiais.....	33
<b>Tabela 12.</b>	Avaliação do potencial da produção de lipase a partir da medida do halo de lipólise em meio de cultivo sólido com tributirina dos microrganismos pré-selecionados.....	38
<b>Tabela 13.</b>	Atividade enzimática da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416 com diferentes nutrientes adicionados ao meio (níveis codificados).....	42

<b>Tabela 14.</b>	Atividade enzimática da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416 em função do enriquecimento do meio de cultivo com água de maceração de milho (AMM) e nitrato de sódio (NaNO <sub>3</sub> ).....	46
<b>Tabela 15.</b>	Temperatura ótima de lipases de diferentes microrganismos.....	53
<b>Tabela 16.</b>	Constante de desnaturação (K <sub>d</sub> ) e tempo de meia vida (t <sub>1/2</sub> ) de lipases obtidas das diferentes temperaturas.....	55
<b>Tabela 17.</b>	Valores teóricos e experimentais das constantes de desnaturação (K <sub>d</sub> ) e dos tempos de meia vida (t <sub>1/2</sub> ) da lipase de extrato enzimático e da lipase comercial de <i>Burkholderia cepacia</i> para as temperaturas de 40, 50 e 60°C.....	58
<b>Tabela 18.</b>	Demanda química de oxigênio (DQO), óleos e graxas, acidez, potencial hidrogeniônico (pH) e alcalinidade total dos efluentes coletados na estação de tratamento e efluente da Micos Cicopal Ltda, em dois momentos diferentes.....	64
<b>Tabela 19.</b>	Matriz codificada e resposta da atividade hidrolítica sobre o efluente da Micos Cicopal Ltda. em função do potencial hidrogeniônico (pH), da concentração de enzima ([E]) e do volume de goma arábica a 7% (GA 7%) durante 30 min de hidrólise.....	66
<b>Tabela 20.</b>	Atividade hidrolítica sobre o efluente da Micos Cicopal Ltda. em função do potencial hidrogeniônico (pH), da concentração de enzima ([E]) e do volume de goma arábica a 7% (GA 7%), após 3 h de hidrólise.....	71
<b>Tabela 21.</b>	Atividade hidrolítica do efluente da indústria Micos Cicopal Ltda. pela lipase comercial Amano lipase PS - <i>Burkholderia cepacia</i> durante 24 h de reação, em processo descontínuo e descontínuo alimentado.....	78

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Reação de hidrólise, ou a reação reversa, síntese, catalisada por lipases.....	6
<b>Figura 2.</b>	Exposição do sítio ativo da lipase de <i>Humicola lanuginosa</i> .....	7
<b>Figura 3.</b>	Reações catalisadas por lipases do tipo não específica.....	8
<b>Figura 4.</b>	Reações catalisadas por lipases do tipo 1,3 específica.....	8
<b>Figura 5.</b>	Hidrólise de uma molécula de tributirina por lipase.....	13
<b>Figura 6.</b>	Reação de hidrólise enzimática do p-nitrofenolpalmitato.....	14
<b>Figura 7.</b>	Diagrama das etapas da pesquisa.....	19
<b>Figura 8.</b>	Microrganismos isolados dos efluentes TDB1(A) e TDB5 (B).....	36
<b>Figura 9.</b>	Halo lipolítico formado pela lipase do microrganismo TEB3 (esquerda) e da cepa de <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416 (direita).....	37
<b>Figura 10.</b>	Atividade enzimática dos microrganismos pré-selecionados, após cultivo em meio líquido, tendo como substrato o p-nitrofenolpalmitato.....	40
<b>Figura 11.</b>	Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados dos diferentes nutrientes adicionados ao meio de cultivo sobre a resposta atividade enzimática da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416.....	43
<b>Figura 12.</b>	Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados do nitrato de sódio e da água de maceração de milho adicionados ao meio de cultivo sobre a resposta atividade enzimática da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416.....	47
<b>Figura 13.</b>	Superfície de resposta e curvas de contorno para a atividade de lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416 em função das concentrações de água de maceração de milho e nitrato de sódio.....	48
<b>Figura 14.</b>	Efeito da temperatura na atividade das lipases de <i>Burkholderia cepacia</i> , na faixa de pH entre 25 a 50°C por 30 minutos.....	51
<b>Figura 15.</b>	Cinética de inativação térmica da lipase do extrato enzimático de <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416 (a) e da lipase comercial Amano lipase PS - <i>Burkholderia cepacia</i> (b).....	54

<b>Figura 16.</b>	Energia de ativação da desnaturação da lipase de extrato enzimático e da lipase comercial de <i>Burkholderia cepacia</i> .....	57
<b>Figura 17.</b>	Atividade das lipases de extrato enzimático e comercial de <i>Burkholderia cepacia</i> em função do pH entre a faixa 3 e 11, a 37°C por 30 min.....	59
<b>Figura18.</b>	Efeito do pH na estabilidade da lipase do extrato enzimático da <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416 (a) e da lipase comercial Amano lipase PS - <i>Burkholderia cepacia</i> (b), na faixa de pH entre 7 e 9 a 37°C por 3 h.....	62
<b>Figura 19.</b>	Eletroforese em gel poliacrilamida (SDS-PAGE 15%), corada por <i>Coomassie</i> , de amostras de lipase comercial Amano lipase PS - <i>Burkholderia cepacia</i> (LC 1, 2 e 3) e marcador padrão (MP).....	63
<b>Figura 20.</b>	Evolução da hidrólise do efluente da indústria Micos Cicopal Ltda. pela lipase comercial Amano lipase PS - <i>Burkholderia cepacia</i> durante 24 h de reação.....	65
<b>Figura 21.</b>	Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados do potencial hidrogeniônico (pH), da concentração de enzima ([E]) e do volume de goma arábica a 7% (GA 7%) durante 30 min de hidrólise, sobre a resposta atividade hidrolítica do efluente da Micos Cicopal Ltda.....	67
<b>Figura 22.</b>	Superfície de resposta e curvas de contorno para a atividade hidrolítica em função do potencial hidrogeniônico (pH) e da concentração de enzima, fixando-se o volume de goma arábica a 7% nos níveis reais 0 (a), 3 (b) e 6 mL (c).....	69
<b>Figura 23.</b>	Evolução da otimização da hidrólise do efluente da indústria Micos Cicopal Ltda. pela lipase comercial Amano lipase PS - <i>Burkholderia cepacia</i> durante 24 h de reação.....	70
<b>Figura 24.</b>	Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados do potencial hidrogeniônico (pH), da concentração de enzima ([E]) e do volume de goma arábica a 7% (GA 7%) durante 3 h de hidrólise, sobre a resposta atividade hidrolítica do efluente da Micos Cicopal Ltda.....	72
<b>Figura 25.</b>	Superfície de resposta e curvas de contorno do delineamento de otimização da atividade hidrolítica em função do potencial hidrogeniônico (pH) e da concentração de enzima, fixando-se o volume de goma arábica a 7% nos níveis reais 0 (a), 3 (b) e 6 mL (c).....	74
<b>Figura 26.</b>	Evolução da hidrólise do efluente da indústria Micos Cicopal Ltda.	

pela lipase comercial Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia* durante 24 h de reação, em processo descontínuo e descontínuo alimentado, com pH 7,5; concentração de enzima de 0,12 g.mL<sup>-1</sup> e volume de goma arábica a 7% de 3 mL..... 77



## LISTA DE APÊNDICES

<b>Apêndice A.</b>	Medidas dos raios das colônias (r), halos de lipólise (R) e relação R/r em meio de cultivo sólido com tributirina dos microrganismos isolados de efluentes industriais e urbanos e dos adquiridos em institutos de pesquisa.....	90
<b>Apêndice B.</b>	Estimativa do efeito de cada nutriente adicionado ao meio de cultivo na resposta atividade enzimática da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416.....	91
<b>Apêndice C.</b>	Análise de variância relativa aos diferentes nutrientes adicionados ao meio de cultivo sobre a resposta atividade enzimática da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416.....	92
<b>Apêndice D.</b>	Análise de variância para o modelo ajustado da atividade enzimática da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416 em função do enriquecimento do meio de cultivo com água de maceração de milho (AMM) e nitrato de sódio (NaNO <sub>3</sub> ).....	93
<b>Apêndice E.</b>	Coeficientes de regressão do modelo ajustado da atividade enzimática da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416 em função do enriquecimento do meio de cultivo com água de maceração de milho (AMM) e nitrato de sódio (NaNO <sub>3</sub> ).....	94
<b>Apêndice F.</b>	Efeito da temperatura na atividade enzimática das lipases de <i>Burkholderia cepacia</i> , nas temperaturas de 40, 50 e 60°C por 120 minutos.....	95
<b>Apêndice G.</b>	Efeito do pH na atividade enzimática das lipases de <i>Burkholderia cepacia</i> , na faixa de pH entre 7 e 9 a 37°C por 3 h	96
<b>Apêndice H.</b>	Análise de variância para o modelo ajustado da atividade hidrolítica sobre o efluente da Micos Cicopal Ltda. em função do potencial hidrogeniônico (pH), da concentração de enzima ([E]) e do volume de goma arábica a 7% (GA 7%) durante 30 min de hidrólise.....	97
<b>Apêndice I.</b>	Coeficientes de regressão do modelo ajustado da atividade hidrolítica sobre o efluente da Micos Cicopal Ltda. em função do potencial hidrogeniônico (pH), da concentração de enzima ([E]) e do volume de goma arábica a 7% (GA 7%) durante 30 min de hidrólise.....	98
<b>Apêndice J.</b>	Análise de variância do modelo completo de otimização da atividade hidrolítica sobre o efluente da Micos Cicopal Ltda. em função do potencial hidrogeniônico (pH), da concentração de enzima ([E]) e do volume de goma arábica a 7% (GA 7%) durante 3 h de hidrólise.....	99

<b>Apêndice L.</b>	Coeficientes de regressão do modelo completo da otimização da atividade hidrolítica sobre o efluente da Micos Cicopal Ltda. em função do potencial hidrogeniônico (pH), da concentração de enzima ([E]) e do volume de goma arábica a 7% (GA 7%) durante 3 h de hidrólise.....	100
--------------------	--	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES

- % - porcentagem  
[E] - concentração de enzima  
AB - ágar batata  
AE - atividade enzimática  
AH - atividade hidrolítica  
AMM - água de maceração de milho  
BC-ALPS - enzima comercial Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia*  
BC25416 - *Burkholderia cepacia* ATCC 25416  
CaCO<sub>3</sub> - ácido carbônico  
DIC - delineamento inteiramente casualizado  
DQO - demanda química de oxigênio  
E<sub>ad</sub> - energia de ativação de desnaturação  
ETDB1 a ETDB5 - efluente da ETE, tanque de decantação, meio AB, microrganismo 1 a 5  
ETE - Estação de Tratamento de Esgotos  
FA - falta de ajuste  
F<sub>d</sub> - fator de diluição  
g.L<sup>-1</sup> - grama por litro  
GA - goma arábica  
h - horas  
IEA1 e IEA2 - efluente industrial, tanque de entrada, meio PCA, microrganismo 1 e 2  
IEB1 a IEB4 - efluente industrial, esporos misto de bactérias e lipases, meio PCA, microrganismo 1 a 4  
IEV1 e IEV2 - efluente industrial, esporos misto de bactérias e lipases, meio VRBA, microrganismo 1 e 2  
ISO - *International Organization for Standardization*  
ITA1 e ITA2 - efluente industrial, tanque de tratamento, meio PCA, microrganismo 1 e 2  
ITB1 a ITB4 - efluente industrial, tanque de tratamento, meio AB, microrganismo 1 a 4  
ITEA1 e ITEA2 - efluente industrial, tanque de equalização, meio PCA, microrganismo 1 e 2  
ITEB1 a ITEB4 - efluente industrial, tanque de equalização, meio AB, microrganismo 1 a 4  
ITEV1 e ITEV2 - efluente industrial, tanque de equalização, meio VRBA, microrganismo 1 e 2  
ITV1 e ITV2 - efluente industrial, tanque de tratamento, meio VRBA, microrganismo 1 e 2  
J - Joule  
K - constante de Arrhenius  
K - Kelvin (temperatura)  
K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> - dicromato de potássio  
K<sub>d</sub> - constante de desnaturação térmica  
kDa - quilo Dalton  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - fosfato dibásico de potássio

L - efeito linear  
LARPF - Laboratório de Tratamento de Águas Residuárias e Processos Fermentativos  
ln - logaritmo natural  
M - molar  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - sulfato de magnésio heptahidratado  
min - minuto  
mL - mililitro  
MM - massa molecular  
mm - milímetro  
MO - microrganismo  
N - normal  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - fosfato monobásico de sódio  
NaNO<sub>3</sub> - nitrato de sódio  
NaOH - hidróxido de sódio  
nm - nanômetro  
°C - graus Celsius  
OS - óleo de soja  
p - probabilidade  
PCA - ágar padrão para contagem  
pH - potencial hidrogeniônico  
pNP - paranitrofenol  
pNPP - paranitrofenolpalmitato  
Q - efeito quadrático  
QM - quadrado médio  
R - constante universal dos gases perfeitos  
R - halo de lipólise  
r - raio da colônia  
R/r - relação halo de lipólise e raio de colônia  
R<sup>2</sup> - coeficiente de determinação  
R<sup>2</sup><sub>aj</sub> - coeficiente de determinação ajustado  
s - segundo  
SDS-PAGE - dodecil sulfato de sódio- eletroforese em gel de poliacrilamida  
SMWW - *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*  
T - temperatura  
t - tempo  
t<sub>1/2</sub> - tempo de meia vida  
U.g<sup>-1</sup> - unidade enzimática específica por grama de proteína  
U.mL<sup>-1</sup> - unidade de atividade enzimática por mililitro  
U/U<sub>0</sub> - atividade relativa  
UBS14 - *Bacillus subtilis* NRRL 14819  
UBS41 - *Bacillus sp* NRRL 41094  
UCG - *Corynebacterium glutamicum*  
UCS - *Candida sp.*  
UCT - *Candida tropicalis* CCT 5846  
UEC - *Escherichia coli*  
UKM - *Kluyveromyces marxianus*  
UKR - *Kocuria rhizophila*  
UPL - *Penicillium lanosum* NRRL 3442  
UZM - *Zymomonas mobilis* CCT 4494

V - volume

VRBA - ágar vermelho violeta bile lactose

xg - x vezes maior que a força gravitacional da Terra

$\mu\text{L}$  - microlitro

$\mu\text{mol}$  - micromol

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1	EFLUENTES.....	3
2.2	ENZIMAS.....	4
2.3	LIPASES.....	6
2.4	PRODUÇÃO DE LIPASES.....	12
2.5	ATIVIDADE LIPOLÍTICA.....	13
<b>2.5.1</b>	<b>Cultivo em meio sólido suplementado com triacilglicerídeos.....</b>	<b>13</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Método espectrofotométrico.....</b>	<b>14</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Método titulométrico.....</b>	<b>15</b>
2.6	APLICAÇÃO DE LIPASES.....	15
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	18
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
4.1	EFLUENTES.....	20
4.2	MICROORGANISMOS.....	20
4.3	ENZIMA.....	20
4.4	SCREENING: ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE MICROORGANISMOS.....	21
4.5	SELEÇÃO DAS CEPAS PRODUTORAS DE LIPASE.....	21
<b>4.5.1</b>	<b>Pré-seleção: cultivo em meio sólido.....</b>	<b>21</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Cultivo em meio líquido.....</b>	<b>22</b>
4.5.2.1	Preparo do inóculo.....	22
4.5.2.2	Fermentação submersa.....	22
4.5.2.3	Extração das enzimas extracelulares produzidas pela fermentação submersa.....	23
4.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	23
<b>4.6.1</b>	<b>Método espectrofotométrico.....</b>	<b>23</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Método titulométrico.....</b>	<b>24</b>
4.7	OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE.....	24
4.8	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA LIPASE.....	27
<b>4.8.1</b>	<b>Efeito da temperatura na atividade da lipase.....</b>	<b>27</b>
<b>4.8.2</b>	<b>Efeito do pH na atividade da lipase.....</b>	<b>27</b>
<b>4.8.3</b>	<b>Efeito da temperatura na estabilidade da lipase.....</b>	<b>28</b>
4.8.3.1	Determinação da constante de desnaturação ( $K_d$ ).....	28
4.8.3.2	Determinação do tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ).....	28
4.8.3.3	Determinação da energia de ativação da desnaturação ( $E_{ad}$ ).....	29
<b>4.8.4</b>	<b>Efeito do pH na estabilidade da lipase.....</b>	<b>29</b>
<b>4.8.5</b>	<b>Determinação da massa molecular da lipase comercial Amano lipase PS – <i>Burkholderia cepacia</i> por eletroforese SDS-PAGE.....</b>	<b>29</b>
4.9	APLICAÇÃO DA LIPASE EM EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE BATATAS FRITAS.....	30

<b>4.9.1</b>	<b>Caracterização do efluente.....</b>	<b>30</b>
4.9.1.1	Análise de demanda química de oxigênio.....	30
4.9.1.2	Análise de óleos e graxas.....	30
4.9.1.3	Análise de acidez.....	31
4.9.1.4	Análise de pH.....	31
4.9.1.5	Análise de alcalinidade total.....	31
<b>4.9.2</b>	<b>Estudo da hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente pela lipase comercial de <i>Burkholderia cepacia</i>.....</b>	<b>31</b>
4.9.2.1	Avaliação da influência do pH, concentração de enzima e agente emulsificante na hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente industrial pela lipase comercial Amano lipase PS – <i>Burkholderia cepacia</i> .....	31
4.9.2.2	Avaliação da influência dos processos descontínuo e descontínuo alimentado na hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente industrial pela lipase comercial Amano lipase PS – <i>Burkholderia cepacia</i> .....	34
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
5.1	SCREENING.....	36
5.2	SELEÇÃO DAS CEPAS PRODUTORAS DE LIPASE.....	37
<b>5.2.1</b>	<b>Cultivo em meio sólido.....</b>	<b>37</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Fermentação em meio líquido.....</b>	<b>39</b>
5.3	OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR <i>Burkholderia cepacia</i>	41
5.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA LIPASE.....	50
<b>5.4.1</b>	<b>Efeito da temperatura na atividade da lipase.....</b>	<b>51</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Estabilidade térmica.....</b>	<b>53</b>
<b>5.4.3</b>	<b>Efeito do pH na atividade da lipase.....</b>	<b>58</b>
<b>5.4.4</b>	<b>Efeito do pH na estabilidade da lipase.....</b>	<b>61</b>
<b>5.4.5</b>	<b>Determinação da massa molecular da lipase comercial Amano lipase PS – <i>Burkholderia cepacia</i> por eletroforese SDS-PAGE.....</b>	<b>63</b>
5.6	APLICAÇÃO DA LIPASE EM EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE BATATAS FRITAS.....	64
<b>5.6.1</b>	<b>Caracterização do efluente.....</b>	<b>64</b>
<b>5.6.2</b>	<b>Estudo da hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente da indústria Micos Cicopal Ltda. pela lipase comercial de <i>Burkholderia cepacia</i></b>	<b>65</b>
5.6.2.1	Avaliação da influência do pH, concentração de enzima e agente emulsificante na hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente industrial pela lipase comercial Amano lipase PS – <i>Burkholderia cepacia</i> .....	65
5.6.2.2	Avaliação da influência dos processos descontínuo e descontínuo alimentado na hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente industrial pela lipase comercial Amano lipase PS – <i>Burkholderia cepacia</i> .....	76
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>90</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento constante da demanda por produtos alimentícios tem possibilitado elevação da produção das indústrias de alimentos e também da carga de resíduos hídricos gerados. Por outro lado, as legislações referentes ao descarte de efluentes no solo e corpos de água têm sido intensificadas, dada a preocupação com o meio ambiente, sendo obrigatório o tratamento do efluente antes do seu descarte, adequando-o aos padrões exigidos pelas vias legais (RIGO et al., 2008).

Indústrias enfrentam dificuldades para cumprir exigências impostas pelos regulamentos rigorosos para descarte de águas residuais e o custo dos sistemas de tratamento pode representar barreira para atingir os padrões de qualidade estabelecidos para lançamento de efluentes nos corpos de água. Assim, a busca do baixo custo, aliada às técnicas eficazes, podem contribuir para reduzir os impactos ambientais gerados pela indústria alimentícia. Um novo campo de estudo tem sido a utilização de enzimas no tratamento de efluentes com elevada carga orgânica, que tem se mostrado um processo viável e de baixo custo, visto que os efluentes apresentam elevadas cargas de nutrientes ainda disponíveis para o crescimento dos microrganismos e a posterior produção de enzimas por processos fermentativos (LEAL et al., 2006; ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010).

O tratamento de efluentes pode ser realizado, por meio do uso de enzima purificada ou extrato enzimático bruto. A vantagem da utilização de enzima purificada reside no fato da enzima estar mais concentrada, possuindo atividade enzimática mais elevada que o extrato bruto, porém o extrato enzimático apresenta baixo custo de produção, podendo ser produzido pela própria indústria (ERTUĞRUL; DÖNMEZ; TAKAÇ, 2007).

Independente deste fato, nos últimos anos vem aumentando o interesse na produção de enzimas em subprodutos e resíduos da agroindústria, bem como a busca de microrganismos com capacidade de produzir enzimas de interesse com altos rendimentos, como por exemplo, o isolamento de 17 cepas de microrganismos de água residuária do processo de extração do azeite de oliva e otimização da produção de lipases de *Bacillus sp.* em meio fermentativo composto por água residuária do processo de extração do azeite de oliva e soro de leite, subproduto de laticínios; e a remoção de matéria orgânica e de fenóis de água residuária da



indústria de beneficiamento de castanha de caju por *Aspergillus niger* AN 400 (ERTUĞRUL; DÖNMEZ; TAKAÇ, 2007; RIGO et al., 2008; RODRIGUES, et al., 2010).

Especificamente, nas águas residuais com elevado teor de lipídeos, a utilização de lipases tem como objetivo hidrolisar os triacilglicerídeos contidos no efluente, em virtude dos óleos e gorduras serem compostos inibitórios em processos de tratamento de águas residuais, e principalmente, dada as exigências ambientais, que estabelecem a quantidade máxima de óleos e graxas no efluente para retorno aos corpos d'água. A aplicação de enzimas hidrolíticas (lipases), em tratamento de águas residuárias de indústrias que possuem elevado teor de lipídios, como as de rações para animais, de suínos; de laticínios e de frigoríficos, tem sido bastante estudada como alternativa ao tratamento de efluente convencional (DHARMSTHITI; KUHASUNTISUK, 1998; MENDES; FREITAS; CASTRO, 2004; BRASIL, 2005; JEGANATHAN; BASSI; NAKHLA, 2006; JEGANATHAN; NAKHLA; BASSI, 2007b; RIGO et al., 2008).

O tratamento de efluente em indústria alimentícia faz parte da preocupação ambiental que toda indústria deve ter. Sobretudo, as que têm seguido a nova tendência do cenário internacional, ou seja, indústrias socialmente responsáveis e preocupadas com questões ambientais. Essa mudança no comportamento das indústrias está ligada não somente à conscientização da importância do problema ambiental, mas principalmente a exigência do mercado, seja para a exportação ou para consumo interno. Os consumidores, cada vez mais, dão preferência a produtos que possuem parâmetros de qualidade, de acordo com normas internacionais e nacionais (ISO 9000, ISO 14000, "Selo Verde", etc). Nesse sentido, muitas empresas têm revisto suas operações industriais e ações, de forma a minimizar o impacto da sua produção ao meio ambiente, o que inclui a adequação dos seus efluentes às condições e padrões de qualidade da água, estabelecidos legalmente pelos órgãos competentes (CAMPOS et al., 2005; COSTA et al., 2007).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 EFLUENTES

Os efluentes industriais e domésticos possuem elevada carga orgânica, que se não forem tratados antes do descarte nos corpos de água irão ocasionar sérios problemas ambientais. Nas últimas décadas, a preocupação com o meio ambiente, especificamente com a água, acarretou em maior rigor nos padrões de descarte de águas residuárias (MENDES et al., 2005).

No Brasil, foi instituída a lei federal nº 9.433, de 8 de janeiro de 1997, referente à política nacional de recursos hídricos que trata da cobrança pelo uso dos corpos de água para o lançamento de efluentes. O Conselho Nacional de Meio Ambiente, por meio da resolução nº 357, de 17 de março de 2005, classificou os corpos de água e também estabeleceu que os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água, após tratamento tecnológico adequado e desde que obedeçam as condições e padrões de qualidade da água e as demais exigências dispostos nesta resolução e em outras normas aplicáveis (BRASIL, 1997; BRASIL, 2005). Assim, por lei, as indústrias têm obrigatoriedade de tratar seus resíduos antes do descarte nos corpos de água.

Atualmente, os poluentes industriais mais preocupantes são os com elevada carga de compostos orgânicos e metais pesados. Os primeiros, por proporcionarem ao resíduo elevada demanda bioquímica de oxigênio, contendo proteínas, carboidratos e lipídios, e o segundo, se ingeridos acumulam-se nos tecidos dos órgãos, provocando efeitos adversos de saúde pública (AGUIAR; NOVAES; GUARINO, 2002; RIGO et. al., 2008).

Nas águas residuárias, os lipídios encontram-se, preferencialmente, na forma de triacilglicerídeos e, em pequena parte, como ácidos graxos livres. Além de representarem perda industrial importante quando presentes em elevadas quantidades nos efluentes, interferem negativamente nos sistemas de tratamento (QUÉMÉNUER; MARTY, 1994; MENDES et al., 2005).

A problemática da fração lipídica reside no fato da sua lenta degradação, favorecimento ao desenvolvimento de microrganismos filamentosos nos sistemas de tratamento por aeração, formação de filmes de óleo nas superfícies aquáticas que

impedem a difusão de oxigênio do ar para esse meio e o mais importante, promovem a mortandade da vida aquática (JUNG; CAMMAROTA; FREIRE, 2002; MENDES et al., 2005; RIGO et al., 2008). No descarte de efluentes contendo lipídios é permitido por legislação até 50 mg.L<sup>-1</sup> de óleos vegetais e gorduras animais (BRASIL, 2005). Sendo assim, processos alternativos têm sido desenvolvidos com intuito da redução da concentração de lipídios nos efluentes, por meio de ação de enzimas, especificamente as lipases (LIMA JÚNIOR et al., 2007).

## 2.2 ENZIMAS

Enzimas são proteínas consideradas biocatalisadores da natureza. São sintetizadas nas células e formadas por longas cadeias de aminoácidos unidas por ligações peptídicas, articuladas em estruturas tridimensionais. Exercem funções vitais intra ou extracelularmente, como o controle dos processos de transformação dos nutrientes em energia e em material celular, e a degradação de nutrientes complexos em substâncias mais simples (LEHNINGER, 1986).

As enzimas podem ser obtidas a partir de animais, plantas ou microrganismos. Hoje, as enzimas obtidas por microrganismos são mais preferidas às derivadas de plantas e animais, em virtude do elevado número de microrganismos produtores, à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, à facilidade de manipulação genética, ao fornecimento regular pela ausência de sazonalidade, ao alto rendimento, ao rápido crescimento da microbiota em meios de baixo custo, à possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais e ao maior controle e eficiência. Além das enzimas oferecerem amplo espectro de características físico-químicas e serem encontradas em diversos *habitats*, como em rejeitos de indústrias de alimentos, solos, sementes, frutos e alimentos apodrecidos (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; CARVALHO et al., 2005; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010).

Os microrganismos são produtores de enzimas, contudo estima-se que destes, apenas 2% dos existentes foram testados como potencial fonte produtora. Os benefícios especiais oferecidos pelas enzimas são a especificidade e as condições brandas para sua obtenção. Com a escolha da enzima correta pode-se

controlar os produtos obtidos e minimizar as reações colaterais indesejáveis, em virtude da especificidade das enzimas (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

A base da classificação das enzimas são as reações químicas que essas catalisam. A nomenclatura enzimática foi estabelecida pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, 2011), com divisão das enzimas em seis grupos principais, nas quais estão inclusas subclasses de acordo com o tipo de reação catalisada (Tabela 1).

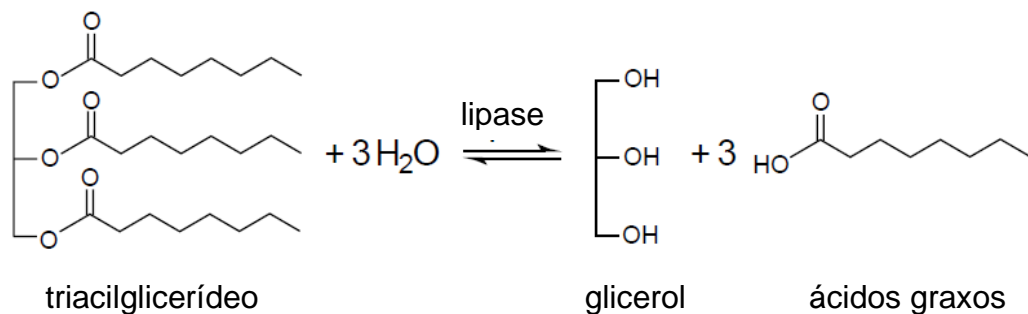
**Tabela 1.** Classificação enzimática conforme a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.

<b>Nº EC-Classe</b>	<b>Função catalítica</b>	<b>Subclasses</b>
1-Oxidoredutases	Catalisam reações de oxidação-redução envolvendo oxigenações e remoção ou adição de átomos de hidrogênio	Desidrogenases Oxidases Hidrogenases Peroxidases
2-Transferases	Catalisam a transferência de grupos de um composto para outro (doador-receptor)	Metiltransferases Glicosiltransferases Aminotransferases
3-Hidrolases	Catalisam a hidrólise de várias reações, atuam em ligações éster, peptídicas e outras funções contendo a ligação CN	Esterases Lipases Fosfatases Proteases
4-Liases	Catalisam reações de clivagem de ligações como CC, CN e CO, e também os processos reversos	Descarboxilases Aldolase Cetoácidolases Hidratases
5-Isomerases	Catalisam processos de isomerização, tais como racemização	Racemases Isomerases Epimerases
6-Ligases	Catalisam a clivagem ou formação de ligações CC, CO, CS, CN, ésteres de fosfato e N-metal	Sintetases

Fonte: *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB, 2011).

## 2.3 LIPASES

As lipases são enzimas solúveis em água, definidas como glicerol éster hidrolases (E.C.3.1.1.3), que catalisam a hidrólise das ligações ésteres de triacilglicerídeos insolúveis, liberando ácidos graxos livres, mono ou diacilglicerídeos na interface óleo-água (Figura 1). Assim, o substrato lipídico utilizado se encontra sob forma de emulsão (WAKELIN; FORSTER, 1997; JAEGUER; REETZ, 1998; LINKO et al., 1998). Em reações com baixa quantidade de água (condições microaquosas), essas enzimas, catalisam reação inversa, a esterificação, formando gliceróis a partir de ácidos graxos livres e glicerol, ou mesmo várias reações de transesterificação. Portanto, a hidrólise de óleos e gorduras é favorecida pela presença de água (MILLER et al., 1988; ARPIGNY; JAEGER, 1999; BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010).



**Figura 1.** Reação de hidrólise, ou a reação reversa, síntese, catalisada por lipases  
Fonte: Jaeger e Reetz (1998).

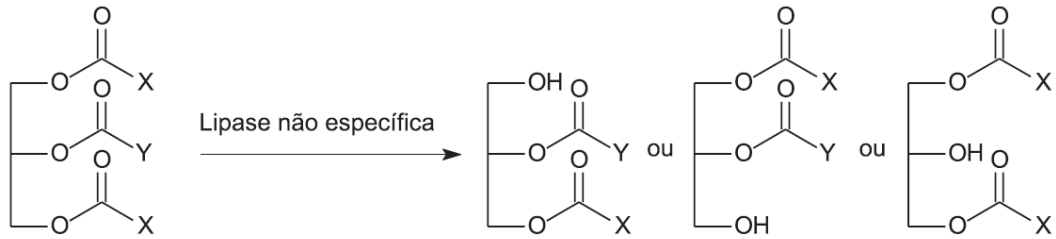
Contudo, as ligações de ésteres também podem ser hidrolisadas por esterases (EC 3.1.1.1). Segundo Houde, Kademi e Leblanc (2004), por muito tempo a distinção entre lipases e esterases foi baseada na ativação interfacial e na presença de uma  $\alpha$ -hélice (cadeia de aminoácidos), chamada de tampa (*lid*) hidrofóbica nas lipases. A ativação interfacial é o aumento significativo na atividade lipolítica, observada na presença de interface lipídio-água, isto é, quando o substrato é insolúvel em água. Enquanto a *lid* hidrofóbica controla o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima, movendo-se apenas na interface lipídio-água e cobrindo o sítio ativo nos demais casos (Figura 2). Sendo assim, a reação de hidrólise na interface lipídio-água é catalisada pela presença dessa *lid*, haja vista que a mesma expõe o sítio ativo da enzima, sugerindo o favorecimento da ativação interfacial das lipases (BRADY et al., 1990; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).



**Figura 2.** Exposição do sítio ativo da lipase de *Humicola lanuginosa*.  
Fonte: As lipases (2011).

Entretanto, estudos demonstraram que as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida antarctica B*, *Burkholderia glumae* foram ativas em substratos não emulsionados e não mostraram ativação interfacial mesmo possuindo a *lid* (VERGER, 1997; JAEGER; REETZ, 1998). Portanto, a presença da *lid* e a ativação interfacial são critérios inadequados para classificar as enzimas como lipolíticas. A lipase, geralmente, é classificada como carboxilesterase, que catalisa preferencialmente a hidrólise de triacilglicerídeos de cadeia longa com dez ou mais átomos de carbono, ou seja, ligações éster tríplexes, com os ácidos oléico, linoléico e linolênico. Diferenciando-se das esterases que atuam sobre triacilglicerídeos com ácidos graxos de cadeia curta com menos de dez átomos de carbono. É necessário ressaltar que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, já o inverso não é verdadeiro (BIER; COLOWICK; KAPLAN, 1955; BROCKMAN; BORGSTROM, 1984; JAEGER; REETZ, 1998; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

As lipases podem ser divididas em três grupos principais, conforme sua regiosseletiva, enantioseletiva e especificidade (BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010). A regiosseletiva é subdividida em: lipases não-específicas, lipases 1,3 específicas e lipases de ácidos graxos específicos. As lipases não-específicas catalisam a hidrólise completa de triacilglicerídeos em ácidos graxos e glicerol, de forma aleatória, sendo mono e diacilglicerídeos produtos intermediários (Figura 3).

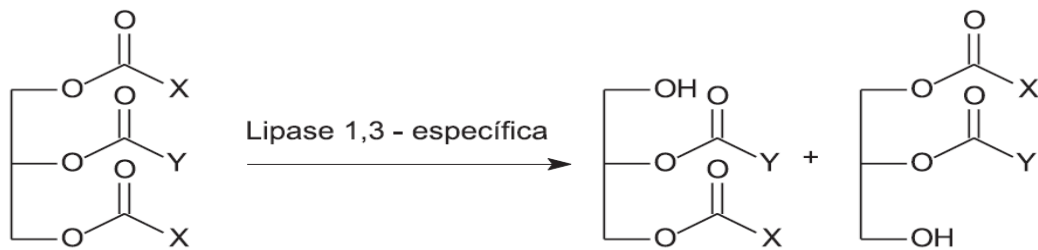


Na qual X e Y são grupos alquila.

**Figura 3.** Reações catalisadas por lipases do tipo não específica.

Fonte: Paques e Macedo (2006).

As lipases 1,3 específicas hidrolisam triacilglicerídeos apenas nas ligações do carbono um e três, formando ácidos graxos, 2 monoacilglicerídeos e 1,2 ou 2,3-diacilglicerídeos, sendo os dois últimos quimicamente instáveis, promovendo a migração do grupo acila, produzindo 1,3-diacilglicerídeos e 1 ou 3 monoacilglicerídeos (Figura 4).



Na qual X e Y são grupos aquila.

**Figura 4.** Reações catalisadas por lipases do tipo 1,3 específica.

Fonte: Paques e Macedo (2006).

As lipases de ácidos graxos específicos são específicas para determinado tipo de ácido graxo, ou mais frequentemente, para grupo específico de ácidos graxos. Elas hidrolisam ésteres de ácidos graxos localizados em qualquer posição do triacilglicerídeo (BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010).

Enantiosseletividade é a capacidade de separar enantiômeros de mistura racêmica. Um dos enantiômeros é quimicamente transformado com maior velocidade que o outro. A formação de estados de transição entre o par de enantiômeros e a enzima é o fenômeno responsável pelas diferentes velocidades de reação (BARREIRO; FERREIRA; COSTA, 1997). Exemplo desta reação é o isômero R-aspartame, que tem sabor amargo, enquanto que o isômero-S tem sabor doce. A

enantioespecificidade de lipases pode variar de acordo com o substrato e esta variação pode ser relacionada com a natureza química do éster.

A especificidade do substrato contribui para a catálise da hidrólise de triacilglicerídeos, di e monoacilglicerídeos e até mesmo fosfolipídios, no caso de fosfolipases. Os substratos naturais são ésteres de glicerol. As enzimas lipolíticas são, portanto, extremamente versáteis, mesmo em meios onde o solvente não é aquoso, catalisam diferentes tipos de reações, como de esterificação, interesterificação, transesterificação (alcoólise e acidólise) e aminólise, relacionadas com as diferentes especificidades e estabilidades das lipases (BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010).

Além disso, as lipases são amplamente distribuídas na natureza, podendo ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), microbiana (bactérias, fungos e leveduras), ou de origem vegetal (canola, mamão e mamona), com variações em suas propriedades catalíticas. Durante muito tempo as lipases foram tradicionalmente obtidas a partir de pâncreas de animais e utilizadas como auxílio digestivo, para consumo humano quer em mistura bruta com outras hidrolases (pancreatina) ou na forma pura comercial. No entanto, o interesse por outras fontes de lipases foi gerado em virtude da escassez de pâncreas e das dificuldades na coleta de material (MUKHERJEE; KIEWITT, 1998; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010).

Grande variedade de bactérias, fungos e leveduras produzem lipases. Linhagens taxonomicamente próximas podem produzir lipases de diferentes tipos. Entre as bactérias têm-se representantes dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Chromobacterium*, *Streptomyces*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Burkholderia* e *Aeromonas*, enquanto, entre os fungos os *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Mucor*, *Beauveria*, *Humicola*, *Rhizomucor*, *Acremonium*, *Alternaria* e *Eurotrium*. Entre as leveduras citam-se os gêneros *Trichosporon*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Yarrowia*, *Rhodotorula* e *Pichia* (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

A síntese de lipases por microrganismos é influenciada por vários fatores, como disponibilidade de oxigênio, de fontes de nutrientes (carbono, nitrogênio e minerais), presença de indutores, presença de agentes que interfiram na interface óleo-água, temperatura de incubação, pH do meio, tempo de cultivo, intensidade da



agitação, bem como, a ação da enzima em relação à especificidade enzima-substrato. A produção de lipase atinge seu ponto máximo quando a cultura entra na fase estacionária de crescimento (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; DOMINGUEZ et al., 2003; ZAREVUCKA et al., 2005; MARTINS; KALIL; COSTA, 2008).

Acerca dos nutrientes, diversas fontes de nitrogênio, incluindo nitrogênio orgânico (farelo de soja, caseína, extrato de levedura, leite em pó e extrato de carne) e fontes de nitrogênio inorgânico (uréia, nitrato de amônio, sulfato de amônio, fosfato monoamônico) foram estudadas. As fontes de nitrogênio desempenham papel importante na síntese de lipase de *Candida sp.*. O fosfato monoamônico ( $700 \text{ U.mL}^{-1}$ ) foi a fonte menos significativa, enquanto a caseína e sulfato de amônio ( $3400 \text{ U.mL}^{-1}$ ) as mais significativas. Como fonte de carbono, muitos óleos vegetais naturais (azeite de oliva, óleo de soja, milho, palma, gergelim, colza, etc) foram usados e induziram a fermentação por proporcionar aumento da produção de lipase. Os lipídios provenientes de gordura animal, como do sebo de ovelha, não possibilitaram a atuação da lipase de *Candida sp.*. Dada a fácil disponibilidade, economia e boa indução lipolítica, o óleo de soja foi bastante utilizado em estudos para produção desse tipo de enzima. Já, os íons metálicos  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+}$  e  $\text{K}^{+}$  foram benéficos à síntese de lipase, enquanto outros íons metálicos, tais como  $\text{Ca}^{+2}$ , não. O íon cálcio mostrou-se formador de complexos com ácidos graxos ionizados, alterando a solubilidade do íon e seu comportamento na interface óleo/água, inibindo a síntese enzimática (TAN et al., 2003).

É necessário conhecer as especificidades do microrganismo para se obter alto rendimento na produção de lipases. Na tabela 2 estão citadas características cinéticas de algumas lipases de diferentes microrganismos. Como toda enzima, as lipases têm pH ótimo característico, na qual sua atividade é máxima (LEHNINGER, 1986). De modo geral, as lipases microbianas apresentam atividade máxima em pH entre 6 e 8. A determinação do pH ótimo é importante, pois é um parâmetro que afeta diretamente a atuação da enzima, visto que pode acarretar alteração da sua estrutura molecular e conseqüentemente perda de atividade (FERNANDES, 2007; RAMANI et al., 2010). Assim como o pH, a temperatura para ótima atividade das lipases é muito ampla. Na literatura, encontram-se temperaturas ótimas desde 30 a 70°C. O conhecimento da melhor temperatura de atuação da lipase visa atingir

estado termodinâmico mais estável, de forma a preservar a estrutura tridimensional (desnaturação) e favorecer o aumento da atividade lipolítica (LEHNINGER, 1986).

**Tabela 2.** Características cinéticas de lipases de origem microbiana.

Microrganismo	Substrato	pH ótimo	T ótima (°C)	Estabilidade		Referência
				pH	T (°C)	
<i>Bacillus thermoleovorans</i> CCR11	pNPLaurato	9-10	60	7 e 9	30-40	Castro-Ochoa et al. (2005)
<i>Aspergillus niger</i> F044	pNPPalmitato óleo de oliva	7	45	2-9	30-65	Zheng-Yu, Jiang-Ke e Yun-Jun (2007)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PseA	pNPPalmitato	8	40	6,5-8,5	40	Gaur, Gupta e Khare (2008)
<i>Penicillium sp</i>	óleo de oliva	8,5	47	7	25	Wolski et al. (2009)
<i>Spirulina platensis</i>	pNPPalmitato	6,5	45	nd*	25	Demir e Tükel (2010)
<i>Pseudomonas gessardii</i>	óleo de oliva	5	30	4-6	30-40	Ramani et al. (2010)
<i>Pentaclethra macrophylla</i> Benth	óleo de coco	7	30	nd*	nd*	Barros, Fleuri e Macedo (2010)
<i>Nigella sativa</i>	óleo de oliva	6	45	nd*	nd*	Barros, Fleuri e Macedo (2010)

\*nd: não determinado; pNP: paranitrofenol.

Com relação às metodologias de determinação da estabilidade ao pH e temperatura não existe padronização, dificultando a comparação de resultados. Contudo, acerca do pH, observa-se no geral, que as lipases bacterianas apresentam maior estabilidade em valores de pH alcalinos, enquanto as lipases fúngicas são mais estáveis em pH ácidos. Para a temperatura, a estabilidade das lipases varia

entre os gêneros, espécies e até entre isoformas produzidas por uma mesma cepa (FERNANDES, 2007).

## 2.4 PRODUÇÃO DE LIPASES

As lipases microbianas, como a maioria das enzimas industriais, podem ser obtidas pela fermentação em estado sólido ou por fermentação submersa (CAMMAROTA; FREIRE, 2006). A fermentação em estado sólido é um processo de cultivo de microrganismos em substrato sólido umedecido. O conteúdo de sólidos varia de 20 a 70% do peso total, com ausência de água livre entre as partículas do substrato. Estima-se que aproximadamente 90% de todas as enzimas industriais são produzidas por fermentação submersa, portanto, é o processo para obtenção de enzimas biotecnológicas, sendo preferível à fermentação em estado sólido por ser de fácil execução e controle tecnológico, possuir rendimentos satisfatórios, principalmente por ser conduzida em meio líquido com nutrientes solúveis, os sólidos são inferiores a  $50 \text{ g.L}^{-1}$  (WOLSKI, 2008; LI; ZONG, 2010). Neste tipo de fermentação, a recuperação das enzimas extracelulares também é facilitada, sendo realizada por filtração simples ou centrifugação para a remoção das células e obtenção do sobrenadante que contém as enzimas de interesse (LIMA et al., 2003).

A otimização das condições de fermentação também é uma rota eficiente para melhorar a produção de lipases, especialmente relacionando-se às fontes de carbono e nitrogênio, aos indutores, à temperatura, ao pH, etc. Nesse sentido, a produção de lipases por cepas bacterianas é mais comum, pois oferecem atividades enzimáticas superiores aos fungos, tendem a ter pH ótimos no neutro ou na alcalinidade, muitas vezes são termoestáveis e na sua maioria são extracelulares, facilitando a sua extração do meio fermentado (JAEGER; EGGERT, 2002; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; LI; ZONG, 2010).

Três fatores devem ser analisados para considerar determinada bactéria como boa produtora de lipase: o microrganismo deve crescer; deve produzir ou liberar lipase nas condições vigentes de crescimento, e o método para verificar a atividade lipolítica deve ter elevada sensibilidade (HASAN; SHAH; HAMEED, 2009).

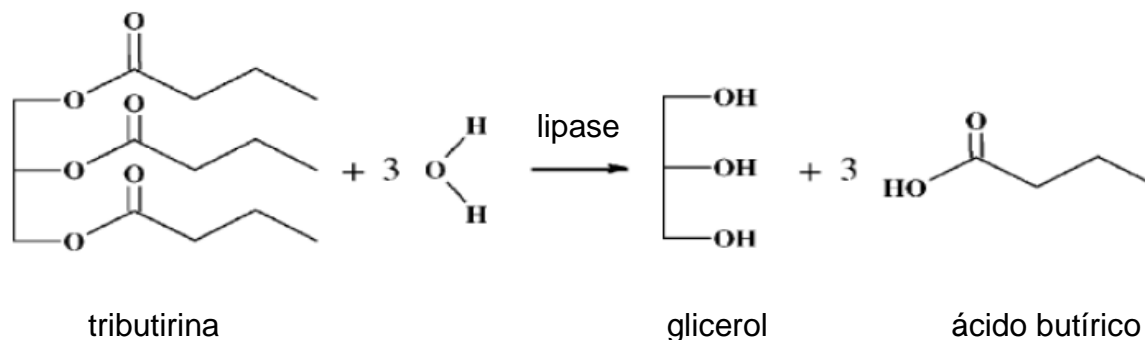
## 2.5 ATIVIDADE LIPOLÍTICA

A lipase libera ácidos graxos do substrato por meio da sua ação hidrolítica. Assim como em qualquer reação enzimática, a atividade lipolítica pode ser determinada direta ou indiretamente, pelo consumo do substrato ou pela formação dos produtos, ou seja, liberação de ácidos graxos (GONGALVES, 2007). Vários métodos, quantitativos e qualitativos, foram desenvolvidos para a medição dessa atividade em preparações de lipase bruta ou purificada, como o cultivo em meio sólido suplementado com triacilglicerídeos, método espectrofotométrico e o titulométrico.

### 2.5.1 Cultivo em meio sólido suplementado com triacilglicerídeos

O uso de meio sólido suplementado com emulsionados de triglicilglicerídeos é uma metodologia padrão para a seleção qualitativa prévia de microrganismos produtores de lipase. O método consiste em obter halo diferenciado ao redor da colônia do microrganismo, por meio da atuação das enzimas sobre substâncias diferenciadas que foram adicionadas ao meio, como tributirina e óleo de oliva (FREIRE, 1996; CARDENAS et al., 2001; GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004).

A tributirina é um triglicerídeo que contém três moléculas de ácido butírico esterificadas com o glicerol. A hidrólise de uma molécula desse lipídio pela lipase resulta em uma molécula de glicerol e três de ácido butírico (Figura 5) (LAI et al., 1997; PARODI, 1997).

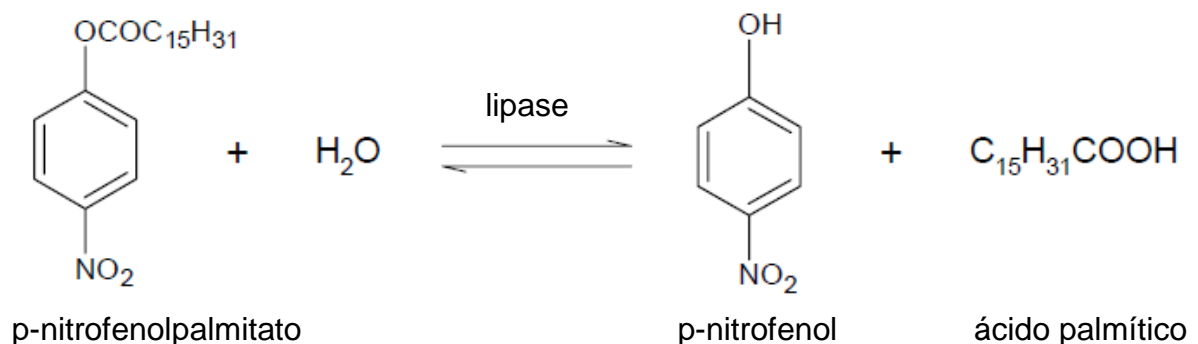


**Figura 5.** Hidrólise de uma molécula de tributirina por lipase.  
Fonte: Kuroiwa-Trzmielina (2007).

Várias pesquisas têm utilizado essa metodologia. Shirazi et al. (1998) avaliaram sete cepas de *Saccharomyces cerevisiae* quanto ao potencial lipolítico, em placas de Petri contendo tributirina, a cepa DMS1848 apresentou maior atividade. Quando essa cepa foi avaliada em meio de cultivo líquido com glicose ou substratos lipídicos (óleo de oliva, ácido oléico, tributirina e óleo de soja), houve produção de lipase apenas no meio contendo substratos lipídicos, evidenciando o caráter indutor desses compostos na produção de lipases. Da mesma forma, Deive, Costas e Longo (2003), avaliando a produção de lipase extracelular por *Kluyveromyces marxianus* em tributirina e ácido oléico concluíram que a tributirina induziu a produção de lipase pelo microrganismo, enquanto o ácido oléico não proporcionou a secreção de enzima. Contudo, essa análise possui o inconveniente de tanto lipases como estereases poderem hidrolisar a tributirina. Assim, é necessária análise quantitativa para inferir qual microrganismo, previamente selecionado no cultivo em meio sólido, possui melhor potencial lipolítico.

### 2.5.2 Método Espectrofotométrico

De forma quantitativa, o método espectrofotométrico baseia-se na hidrólise lipolítica do p-nitrofenilpalmitato em p-nitrofenol e ácido palmítico (Figura 6), resultando em coloração amarela que é intensificada em pHs alcalinos. O p-nitrofenol liberado é detectado em espectrofotômetro a 405 nm (PARUL JAIN; SULAKSHANA JAIN; GUPTA, 2005).



**Figura 6.** Reação de hidrólise enzimática do p-nitrofenilpalmitato.

Fonte: Fernandes (2007).

Neste método há a adição de Triton X-100, um surfactante, com intuito de aumentar a permeabilidade das células de alguns microrganismos, favorecendo a secreção das lipases extracelulares por meio da membrana. E o sal, a função de

diminuir a camada de solvatação da enzima, possibilitando a lipase acoplar com o substrato apolar (CORZO; REVAH, 1999).

### 2.5.3 Método Titulométrico

O método mais comum de determinação da atividade de lipases em ensaio enzimático é pela titulação de ácidos graxos, liberados pela hidrólise dos triacilglicerídeos do óleo. A atividade da lipase é definida como a quantidade de enzima que libera 1,0  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo livre do óleo por minuto, nas condições do teste, que é dependente da concentração de substrato do meio, pH e temperatura ótimos da enzima e tempo de reação de hidrólise (GONGALVES, 2007).

## 2.6 APLICAÇÃO DE LIPASES

As lipases têm encontrado aplicações promissoras em grande variedade de produtos biotecnológicos, como na indústria química (detergentes, biossurfactantes e biodiesel), na indústria alimentícia (óleos e gorduras modificados, aditivos), na indústria de papel, fármacos, têxteis, cosméticos e couros (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; MARTINS; KALIL; COSTA, 2008; BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010), como pode ser observado na tabela 3.

A utilização de lipases no tratamento de efluentes tem sido estudada, visto que as águas residuais provenientes de laticínios, abatedouros, indústrias de produtos fritos contém óleo e graxa em quantidade significativa, o que não é propenso à degradação pelo tratamento de efluente convencional. A eliminação direta deste tipo de águas residuais por processos anaeróbios convencionais causa problemas graves. Por exemplo, lipídios tendem a aderir à superfície de lodo, o que limita o transporte de substratos solúveis para o microrganismo e reduz a eficiência operacional. Além disso, resulta na produção de espuma e odores desagradáveis. Portanto, estudos demonstram que o pré-tratamento deste tipo de efluente catalisado pela lipase permite melhoria notável na eficiência do tratamento convencional (CAMMAROTA; FREIRE, 2006; LI; ZONG, 2010).

**Tabela 3.** Aplicações industriais das lipases.

<b>Setor alimentício</b>	<b>Efeito Utilizado</b>	<b>Produto</b>
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite	Agente aromatizante para manufatura de produtos lácteos
Panificação	Melhoramento do sabor e/ou qualidade, prolongamento do tempo de prateleira	Confeitos e bolos
Bebidas	Melhoramento do aroma e aceleração da fermentação, por remoção de lipídios	Bebidas alcoólicas (vinho e outras)
Processamento de derivados do ovo	Melhoramento da qualidade do ovo por hidrólise dos lipídios	Maionese, molhos e cremes
Processamento de carne e peixe	Desenvolvimento de aroma e remoção de excesso de gorduras	Produtos embutidos
Processamento de óleos	Transesterificação de óleos naturais; Hidrólise de óleos (ácidos graxos), diacilglicerídeos	Óleos e gorduras modificadas
<b>Setor químico</b>		
Química fina	Síntese de ésteres	Ésteres
Detergentes	Remoção de manchas de óleo e gorduras	Detergentes
Farmacêutico	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivos
Analítico	Análise de triacilglicerídeos no sangue	Diagnóstico
Cosmético	Remoção de lipídios	Cosméticos em geral
Curtume	Remoção de gorduras das peles dos animais	Produtos de couro
Diversos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas	Limpeza de tubulação, tratamento de efluentes

Fonte: Castro, Mendes e Santos (2004).

Nos estudos realizados por Jeganathan, Nakhla e Bassi (2007a) com o pré-tratamento de águas residuárias oleosas por lipase imobilizada, observou-se que

a utilização da lipase imobilizada aumentou a biodegradabilidade dos efluentes, sendo a redução da demanda química de oxigênio e de óleo e gordura de 49 e 45% sem pré-tratamento, e 65 e 64% com pré-tratamento, respectivamente. Além de poder reutilizar a lipase imobilizada por até quatro ciclos com uma atividade de 55%. Rigo et al. (2008), comparando a aplicação de lipase comercial Lipolase 100T e lipase obtida por fermentação em estado sólido na pré-hidrólise das águas residuárias de indústria de carne suína e bovina, concluíram que o uso de grande concentração de ambas as lipases diminuiu a biodegradabilidade do resíduo, ou seja, dificultou a redução da demanda química de oxigênio do efluente. Enquanto que o uso de pequenas quantidades das lipases no pré-tratamento enzimático mostrou-se promissor para a biodegradação de efluentes industriais, pois as águas residuais contendo  $1200 \text{ mg.L}^{-1}$  de óleos e graxas pré-tratados com a lipase obtida por fermentação em estado sólido apresentou diminuição da demanda química de oxigênio de 22% em relação ao efluente sem tratamento e 3,5 vezes superior ao pré-tratamento com a lipase comercial Lipolase 100T.

Nas estações de tratamento dos efluentes gordurosos, a elevada concentração de triacilglicerídeos inicialmente é hidrolisada pelas lipases para, em seguida, ser transformada em fonte de carbono para as bactérias durante o tratamento biológico do efluente e, posteriormente, ser convertido em biomassa (lodo ativado) (DUEHOLM; ANDREASEN; NIELSEN, 2001). Outra vantagem é a possibilidade da utilização dos efluentes industriais ricos em lipídios para a produção das lipases que serão utilizadas no tratamento do efluente, sendo um processo viável e de baixo custo, visto que este apresenta elevada carga de nutrientes ainda disponíveis para crescimento microbiano e possibilita posterior produção de enzimas (ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010).



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

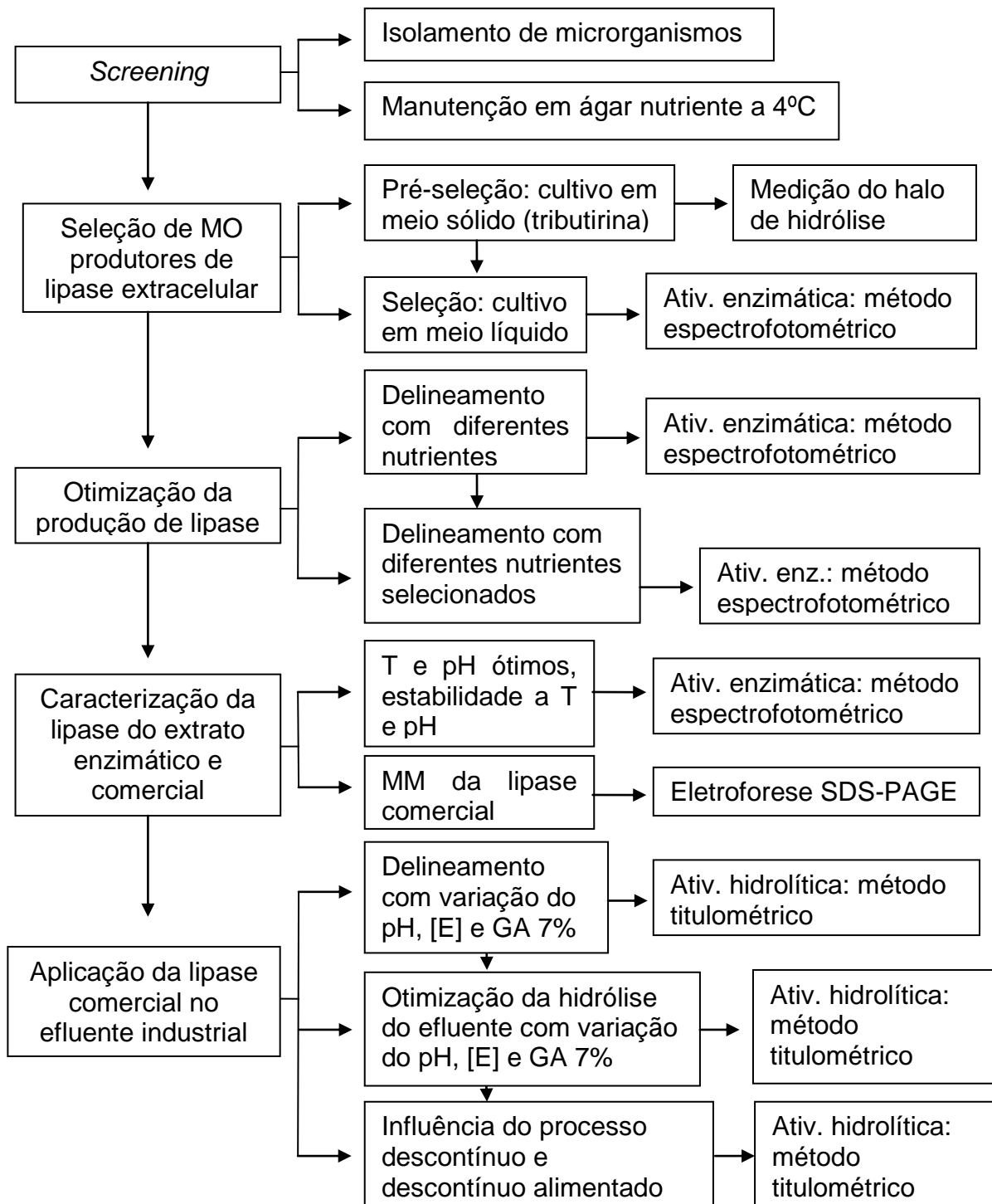
Isolar, selecionar e cultivar microrganismos produtores de lipases para aplicar no tratamento de efluente de indústria de batata frita.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar bactérias produtoras de lipase do efluente industrial e urbano;
- Selecionar bactérias com elevada atividade hidrolítica;
- Quantificar a atividade enzimática das cepas de bactérias selecionadas;
- Estudar a produção de lipase por fermentação submersa, da bactéria selecionada com maior atividade enzimática, tendo como variáveis a água de maceração de milho, a concentração de óleo de soja e as fontes minerais;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas da lipase selecionada;
- Estudar a hidrólise do efluente de uma indústria de alimentos, utilizando como variáveis o pH, a concentração de lipase, o agente emulsificante e o tipo de processo (descontínuo ou descontínuo alimentado).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O diagrama da figura 7 apresenta as etapas de isolamento e seleção de microrganismos, produção de lipases e tratamento do efluente da indústria Micos Cicopal Ltda.



**Figura 7.** Diagrama das etapas da pesquisa.

Na qual: MO (microrganismo); T (temperatura); pH (potencial hidrogeniônico); MM (massa molecular); [E] (concentração de enzima); GA (goma arábica).

#### 4.1 EFLUENTES

Os efluentes para isolamento e seleção de microrganismos produtores de lipase foram coletados na indústria Micos Cicopal Ltda. e na Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) de Goiânia. Na empresa coletou-se amostras do efluente em três pontos: na entrada do tanque de tratamento de efluente, no tanque equalizador e no tanque de tratamento, além de amostras do extrato de lipase e esporos mistos de bactérias e lipases, utilizados no tratamento do efluente da empresa. Na ETE de Goiânia o efluente foi coletado do tanque decantador. Os efluentes utilizados para os ensaios de hidrólise dos triacilglicerídeos por lipases foram coletados na indústria Micos Cicopal Ltda. na entrada do tanque de tratamento de efluente (tanque de recepção).

#### 4.2 MICRORGANISMOS

Além dos microrganismos isolados dos efluentes, outros microrganismos utilizados para a avaliação do potencial de produção de lipase foram obtidos a partir de cepas cedidas pelo Laboratório de Tratamento de Águas Residuárias e Processos Fermentativos (LARPF) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA-UNICAP). A cepa de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 (BC25416) foi doada pela Fundação Tropical André Tosello, da coleção de culturas tropicais. Os microrganismos cedidos pelo LARPF foram *Candida tropicalis* CCT 5846 (UCT); *Candida sp.* (UCS); *Zymomonas mobilis* CCT 4494 (UZM); *Escherichia coli* (UEC); *Kluveromyces marxianus* (UKM); *Kocuria rhizophila* (UKR); *Bacillus subtilis* NRRL 14819 (UBS14); *Corynebacterium glutamicum* (UCG); *Bacillus sp* NRRL 41094 (UBS41) e *Penicillium lanosum* NRRL 3442 (UPL).

#### 4.3 ENZIMA

Enzima comercial Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia* (BC-ALPS), com atividade enzimática de 30.000 U.g<sup>-1</sup>, foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

#### 4.4 SCREENING: ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS

Alíquotas dos efluentes foram semeadas, em placas de Petri, contendo diferentes meios, conforme metodologia descrita pela *American Public Health Association* (APHA, 2005). Os meios utilizados foram: ágar batata (AB), para seleção de bolores e leveduras. A incubação foi realizada em estufa bacteriológica a 25°C por 72 h. Ágar vermelho violeta bile lactose (VRBA) foi utilizado para seleção de bactérias, do grupo dos coliformes totais e fecais. Ágar padrão para contagem (PCA) foi utilizado para isolamento geral de microrganismos (bactérias e fungos), ambos incubados a 37°C por 48 h.

Após a incubação, as placas foram analisadas acerca do desenvolvimento de microrganismos. As colônias foram selecionadas por meio de análise visual, considerando as diferenças de formato, a coloração e a estruturação entre as diversas colônias formadas. As colônias que apresentaram semelhanças em placas diferentes também foram selecionadas, para evitar a exclusão de microrganismos diferentes, porém com características de colônias semelhantes. Para o isolamento, as colônias selecionadas foram inoculadas em placa de Petri, contendo meio ágar nutriente, segundo a técnica de esgotamento por estria e incubados a 30°C por 48 h em estufa bacteriológica (APHA, 2005). Uma vez isolados, os microrganismos dos efluentes foram devidamente codificados.

A manutenção das cepas foi realizada pela semeadura dos microrganismos em tubo de ensaio com ágar nutriente inclinado pH 7,0, submetidos à incubação a 30°C por 48 h em estufa bacteriológica e em seguida, armazenados em refrigerador a 4°C.

#### 4.5 SELEÇÃO DAS CEPAS PRODUTORAS DE LIPASE

##### 4.5.1 Pré-seleção: cultivo em meio sólido

A pré-seleção das cepas produtoras de lipase foi realizada pela análise de ocorrência de um halo transparente (zona opaca) ao redor da colônia, devido o cultivo ter sido realizado em meio contendo tributirina, conforme metodologia proposta por Freire (1996). Pequena fração de cada cepa foi inoculada em placa de

Petri contendo 0,5% de peptona, 0,3% de extrato de levedura, 2% de ágar e 0,1% de tributirina, pH final 6,0 e incubada a temperatura de 30°C por 48 h. Após o período de incubação, mediu-se com paquímetro o raio da colônia (r) e o raio do respectivo halo de lipólise (R) de cada amostra. As cepas que apresentaram relação R/r maior que 2,0 mm foram selecionadas e submetidas à fermentação em meio de cultivo líquido.

O cultivo em meio sólido foi realizado por meio de delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quarenta microrganismos e três repetições. A análise de ocorrência do halo transparente foi realizada em triplicata e as médias obtidas foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

#### **4.5.2 Cultivo em meio líquido**

As bactérias pré-selecionadas em meio sólido contendo tributirina foram utilizadas no cultivo em meio líquido. Para isso, as cepas em manutenção, foram repicadas em tubo de ensaio com ágar nutriente inclinado pH 7,0 e incubadas a 30°C por 48 h em estufa bacteriológica e em seguida, utilizadas no preparo do inóculo para a fermentação em meio líquido.

##### **4.5.2.1 Preparo do inóculo**

O preparo do inóculo foi realizado com o intuito de melhorar a adaptação e diminuir o período de tempo da fase lag durante o crescimento microbiano. A partir dos tubos de ensaio com ágar nutriente inclinado foi realizada a raspagem dos microrganismos com alça de platina e estes foram transferidos para erlenmeyers de 125 mL, contendo 5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 5 g.L<sup>-1</sup> de peptona e 1% de óleo de soja, na proporção de 1:20 do inóculo em relação ao meio de cultivo. Os erlenmeyers foram incubados a 30°C durante 48 h, sob agitação em banho Maria (FREIRE, 1996). Após o período de incubação, 10 mL do inóculo foram transferidos para cada reator (erlenmeyer) para realização das fermentações.

##### **4.5.2.2 Fermentação submersa**

A fermentação submersa foi realizada para possibilitar a produção de

lipases extracelulares pelos microrganismos do inóculo. As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers com capacidade de 125 mL e incubados a 30°C durante 72 h, sob agitação em banho Maria. Fizeram parte do meio de cultivo o extrato de levedura (5 g.L<sup>-1</sup>), a peptona (5 g.L<sup>-1</sup>) e o óleo de soja (1%).

Os experimentos realizados para otimização da produção da lipase foram conduzidos na presença de diferentes nutrientes, como água de maceração de milho, fosfato monobásico de sódio, óleo de soja, sulfato de magnésio heptahidratado, fosfato dibásico de potássio, nitrato de sódio, peptona, extrato de levedura e água destilada. As concentrações desses compostos variaram conforme os delineamentos apresentados no item 4.7.

#### 4.5.2.3 Extração das enzimas extracelulares produzidas por fermentação submersa

A extração das enzimas extracelulares foi realizada após o término da fermentação. Alíquota de 5 mL do meio reacional foi centrifugada a 2000 xg durante 15 min, para a separação da biomassa bacteriana da lipase extracelular. Junto ao sobrenadante permaneceram as enzimas extracelulares e no precipitado a biomassa bacteriana. Os sobrenadantes provenientes das diferentes fermentações foram utilizados como extrato enzimático para análise de atividade enzimática, conforme método descrito no item 4.6.1.

A bactéria que apresentou maior atividade enzimática foi selecionada para a otimização da produção de lipase a partir da concentração dos seguintes nutrientes: água de maceração de milho (subproduto da indústria alimentícia), óleo de soja e fontes de sódio, magnésio, potássio e nitrato. As concentrações desses compostos variaram conforme os delineamentos apresentados no item 4.7.

## 4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

### 4.6.1 Método Espectrofotométrico

A atividade enzimática foi determinada conforme a metodologia descrita por Parul Jai, Sulakshana Jain e Gupta (2005). No poço da placa de Elisa foram adicionados 100 µL de solução, contendo tampão fosfato de sódio pH 7 (0,1 M),

0,9% de Triton X-100 e cloreto de sódio 0,27 M, além de 100 µL de amostra e 20 µL de substrato p-nitrofenolpalmitato (pNPP). A mistura foi incubada por 30 min em banho Maria a 37°C. A análise do branco foi realizada com o mesmo meio reacional, porém sem a adição da amostra. A reação foi paralisada em micro-ondas com potência média-alta durante 30 s. Após o resfriamento da placa de Elisa, as leituras das amostras foram feitas em espectrofotômetro a 405 nm. A atividade enzimática evidenciou-se pela liberação do p-nitrofenol (pNP) que apresentou coloração amarelada. A unidade de atividade enzimática foi definida como sendo 1 µmol. min<sup>-1</sup> de p-nitrofenol liberado do substrato.

#### 4.6.2 Método titulométrico

Alíquotas do meio reacional foram analisadas acerca da atividade lipolítica, conforme método descrito por Macedo, Park e Pastore (1997), com adaptações. Para a determinação da atividade lipolítica, 1 mL do meio reacional foi transferido para um erlenmeyer contendo 5 mL de água destilada nos tempos 0 (branco) e 30 min de reação. Os ácidos graxos liberados durante a reação foram titulados com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,01 N na presença de solução alcoólica de fenolftaleína a 1%. A unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido graxo por minuto. A atividade hidrolítica foi calculada utilizando-se a equação 1.

$$AH = \frac{(Vt_{30'} - Vt_{0'}) * 1000 * F_d * N_{NaOH}}{t} \quad (\text{Eq. 1})$$

Na qual: AH = atividade hidrolítica (U/mL); Vt<sub>30'</sub> = volume de NaOH após 30 min de reação; Vt<sub>0'</sub> = volume de NaOH no tempo 0 min de reação; N<sub>NaOH</sub> = normalidade do NaOH; t = tempo total de reação; F<sub>d</sub> = fator de diluição.

#### 4.7 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE

Para otimização da produção da lipase, proveniente da bactéria com maior potencial lipolítico foi realizado inicialmente, um delineamento exploratório

fatorial fracionário  $2^{6-2}$ , para avaliar o efeito da concentração de água de maceração de milho, óleo de soja e fontes de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ). Peptona e extrato de levedura foram utilizados na concentração de  $1 \text{ g.L}^{-1}$ . O delineamento experimental totalizou dezoito ensaios (Tabela 4). Os níveis de variação do delineamento estão apresentados na tabela 5.

**Tabela 4.** Matriz codificada para verificar a produção de lipase com diferentes nutrientes adicionados ao meio.

Ensaio	AMM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	OS	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$\text{NaNO}_3$
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1	1	-1
3	-1	1	-1	-1	1	1
4	1	1	-1	-1	-1	1
5	-1	-1	1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1	-1	1
7	-1	1	1	-1	-1	-1
8	1	1	1	-1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1	1
10	1	-1	-1	1	1	1
11	-1	1	-1	1	1	-1
12	1	1	-1	1	-1	-1
13	-1	-1	1	1	1	-1
14	1	-1	1	1	-1	-1
15	-1	1	1	1	-1	1
16	1	1	1	1	1	1
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0

AMM: água de maceração de milho;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : fosfato monobásico de sódio; OS: óleo de soja;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : sulfato de magnésio heptahidratado;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : fosfato dibásico de potássio;  $\text{NaNO}_3$ : nitrato de sódio.

**Tabela 5.** Níveis de nutrientes adicionados ao meio, utilizados para verificar a produção de lipase.

Variável	Nível		
	-1	0	1
Água de maceração de milho ( $\text{g.L}^{-1}$ )	5	15	30
Fosfato monobásico de sódio ( $\text{g.L}^{-1}$ )	0	2	4
Óleo de soja (%)	4	8	12
Sulfato de magnésio heptahidratado ( $\text{g.L}^{-1}$ )	0,1	0,2	0,3
Fosfato dibásico de potássio ( $\text{g.L}^{-1}$ )	2	3	4
Nitrato de sódio ( $\text{g.L}^{-1}$ )	0	3	6

As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers com capacidade de 125 mL, incubados a  $30^\circ\text{C}$  durante 72 h, sob agitação em banho Maria. A atividade



enzimática da lipase foi quantificada pelo método espectrofotométrico, conforme item 4.6.1. Após a avaliação dos resultados, os dois nutrientes que apresentaram maior efeito sobre a atividade enzimática foram escolhidos e avaliados com delineamento central composto rotacional, que totalizou 11 experimentos, conforme apresentado na tabela 6.

**Tabela 6.** Matriz codificada do delineamento para a produção de lipase com variação dos teores de água de maceração de milho (AMM) e nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ).

Ensaio	AMM	$\text{NaNO}_3$
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	-1,4142	0
9	0	1,4142
10	1,4142	0
11	0	-1,4142

AMM: água de maceração de milho;  $\text{NaNO}_3$ : nitrato de sódio.

Os níveis de variação do segundo delineamento estão apresentados na tabela 7. A concentração dos demais nutrientes, óleo de soja, e fontes de magnésio e potássio foram as mesmas que apresentaram melhores resultados de produção da lipase.

**Tabela 7.** Níveis codificados e reais de água de maceração de milho e nitrato de sódio, utilizados para a produção de lipase no delineamento experimental.

Variável	Nível				
	$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
Água de maceração de milho ( $\text{g.L}^{-1}$ )	5,858	10	20	30	34,142
Nitrato de sódio ( $\text{g.L}^{-1}$ )	0,1716	1	3	5	5,8284

$\alpha = 1,42$ .

As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers com capacidade de 125 mL e incubados a 30°C durante 72 h, sob agitação em banho Maria. A atividade enzimática da lipase foi quantificada pelo método espectrofotométrico, conforme descrito no item 4.6.1.

Após a otimização da atividade enzimática foram realizadas três repetições da condição ótima para a produção de lipase, visando à validação do modelo matemático proposto. As fermentações também foram conduzidas em erlenmeyers com capacidade de 125 mL, incubados a 30°C durante 72 h, sob agitação em banho Maria, utilizando os valores obtidos na otimização. A atividade enzimática da lipase foi quantificada pelo mesmo método espectrofotométrico, conforme descrito no item 4.6.1.

## 4.8 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA LIPASE

Após a otimização da produção, o extrato enzimático e a lipase comercial (Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia*) foram caracterizadas acerca da atividade ótima e estabilidade em diferentes temperaturas e pHs.

### 4.8.1 Efeito da temperatura na atividade da lipase

A temperatura ótima de atividade da lipase foi determinada pela metodologia espectrofotométrica já descrita. Analisou-se a faixa de temperatura entre 25 a 50°C. O efeito da temperatura na atividade da lipase foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos (25, 30, 35, 40, 45 e 50°C), três repetições e as análises foram realizadas em triplicata.

### 4.8.2 Efeito do pH na atividade da lipase

A determinação do pH ótimo de atividade enzimática foi verificada pela metodologia espectrofotométrica já descrita. Analisou-se a faixa de pH de 3,0 a 11,0, com solução tampão citrato 0,1 M para os pHs de 3,0 a 5,0, tampão fosfato 0,1 M para os pHs de 6,0 a 8,0 e tampão carbonato-bicarbonato para pHs de 9,0 a 11,0. O efeito do pH na atividade da lipase foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com nove tratamentos (pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 e 11,0), três repetições e as análises foram realizadas em triplicata.

### 4.8.3 Efeito da temperatura na estabilidade da lipase

A estabilidade térmica da lipase foi aferida em termos de tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ). As temperaturas estudadas foram 40, 50 e 60°C. As amostras foram coletadas nos tempos 0, 15, 30, 45, 60 e 120 min de exposição e analisadas acerca da atividade enzimática conforme método espectrofotométrico já descrito. O efeito da temperatura na estabilidade da lipase foi conduzido em delineamento fatorial 3x6 e as análises realizadas em triplicata. Os dados foram analisados por meio da análise de regressão simples, sendo obtidos modelos matemáticos lineares ou quadráticos e gráficos para cada temperatura estudada.

#### 4.8.3.1 Determinação da constante de desnaturação ( $K_d$ )

A constante de desnaturação térmica enzimática foi obtida pela regressão linear (Equação 2) dos dados experimentais do item 4.8.3, ou seja, os logaritmos naturais da atividade relativa  $U/U_0$  [atividade lipolítica em determinado tempo ( $U$ ), dividida pela atividade lipolítica inicial ( $U_0$ )] em função do tempo de exposição da lipase. A constante de desnaturação equivale à inclinação da reta na temperatura em análise.

$$\ln(U/U_0) = -K_d \times t \quad (\text{Eq. 2})$$

Na qual:  $\ln$  = logaritmo natural;  $U/U_0$  = atividade relativa;  $K_d$  = constante de desnaturação ( $\text{min}^{-1}$ );  $t$  = tempo (min).

#### 4.8.3.2 Determinação do tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ )

O tempo de meia vida da enzima foi determinado a partir da constante de desnaturação térmica, conforme equação 3.

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{K_d} \quad (\text{Eq. 3})$$

Na qual:  $t_{1/2}$  = tempo de meia vida (min);  $\ln$  = logaritmo natural;  $K_d$  = constante de desnaturação ( $\text{min}^{-1}$ ).

#### 4.8.3.3 Determinação da energia de ativação da desnaturação ( $E_{ad}$ )

Para a determinação da energia de ativação catalisada pela lipase em estudo, os valores de  $K_d$  foram linearizados conforme metodologia de Arrhenius. A regressão linear obedeceu a equação 4, sendo a energia de ativação ( $E_{ad}$ ) a inclinação dessa reta.

$$\ln K_d = \ln K - \left( \frac{E_{ad}}{R \times T} \right) \quad (\text{Eq. 4})$$

Na qual:  $K_d$  = constante de desnaturação ( $\text{min}^{-1}$ );  $K$  = constante de Arrhenius;  $E_{ad}$  = energia de ativação de desnaturação ( $\text{J.mol}^{-1}$ );  $R$  = constante universal dos gases perfeitos ( $\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ );  $T$  = temperatura (K).

#### 4.8.4 Efeito do pH na estabilidade da lipase

Os valores de pH estudados foram 7,0; 8,0 e 9,0 e as amostras foram coletadas nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 min de exposição. A atividade enzimática foi determinada conforme método espectrofotométrico já descrito. O efeito do pH na estabilidade da lipase foi conduzido em delineamento fatorial 3x8 e as análises em triplicata. Os dados obtidos foram analisados e elaborou-se gráficos para os pHs estudados.

#### 4.8.5 Determinação da massa molecular da lipase comercial Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia* por eletroforese SDS-PAGE

A massa molecular da lipase comercial de *Burkholderia cepacia* foi determinada no sistema de eletroforese desnaturante (Hoefer mini VE system – Amersham Biosciences) em gel de poli-acrilamida a 15% (SDS-PAGE), conforme metodologia descrita por Laemmli (1970).

Alíquota de 10 µL da amostra foi misturada a 10 µL do tampão de amostra e fervidas em banho Maria. Posteriormente, 20 µL da amostra foram transferidos para o gel. Foi utilizada alíquota de 20 µL do marcador como padrão. A corrida eletroforética foi realizada em triplicata e em amperagem constante de 40 mA, em tampão TRIS-glicina. Ao final da corrida, as bandas no gel foram submetidas ao corante *Coomassie Brilliant Blue R-250*. O marcador utilizado para a determinação da massa molecular continha as seguintes proteínas: ribonuclease A (12,6 kDa), quimotripsinogênio A (25 kDa), ovoalbumina (45 kDa), albumina bovina (69 kDa).

#### 4.9 APLICAÇÃO DA LIPASE EM EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE BATATAS FRITAS

A aplicação da lipase comercial visou auxiliar no tratamento do efluente da indústria Micos Cicopal Ltda., contendo resíduo oleoso da fritura de batatas.

##### 4.9.1 Caracterização do efluente

Os efluentes da Cicopal Indústria de Alimentos Ltda. foram coletados na entrada do tanque de tratamento de efluente (tanque de recepção), antes de qualquer tratamento do mesmo, em dois momentos distintos. As análises realizadas para caracterização do efluente foram: demanda química de oxigênio, óleos e graxas, acidez, pH e alcalinidade total, todas realizadas em triplicata, conforme *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (SMWW) (APHA, 2005).

###### 4.9.1.1 Análise de demanda química de oxigênio

A demanda química de oxigênio foi determinada pelo método titulométrico (digestão com  $K_2Cr_2O_7$ ), conforme método SMWW 5220 C (APHA, 2005).

###### 4.9.1.2 Análise de óleos e graxas

Os óleos e graxas foram determinados pelo método de Soxhlet, conforme método SMWW 5520 D (APHA, 2005).

#### 4.9.1.3 Análise de acidez

A acidez do efluente foi determinada pelo método de titulação potenciométrica, com hidróxido de sódio 0,01 N até pH 8,3, conforme SMWW 2310 B (APHA, 2005).

#### 4.9.1.4 Análise de pH

O pH foi determinado pelo método eletrométrico, em potenciômetro modelo mPA-210, conforme metodologia SMWW 4500 B de APHA (2005).

#### 4.9.1.5 Análise de alcalinidade total

A alcalinidade total foi determinada pelo método de titulação potenciométrica, com ácido sulfúrico 0,02 N até pH 4,5, conforme método SMWW 2320 B (APHA, 2005).

### **4.9.2 Estudo da hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente pela lipase comercial de *Burkholderia cepacia***

#### 4.9.2.1 Avaliação da influência do pH, concentração de enzima e agente emulsificante na hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente industrial pela lipase comercial Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia*

As variáveis independentes analisadas para o tratamento do efluente foram o pH, a concentração de enzima em relação ao efluente e o volume de goma arábica a 7% utilizado (agente emulsificante), sendo a variável resposta o grau de hidrólise dos triacilglicerídeos. A avaliação dos parâmetros experimentais foi realizada por meio de delineamento central composto rotacional, com 18 experimentos. Os valores codificados de cada variável e os níveis de variação do delineamento estão apresentados nas tabelas 8 e 9, respectivamente.

**Tabela 8.** Matriz codificada do delineamento para verificar o grau de hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente industrial em função do pH, da concentração de enzima ([E]) e do volume de goma arábica a 7% (GA 7%).

Ensaio	pH	[E]	GA 7%
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0

As reações foram conduzidas em erlenmeyers com capacidade de 125 mL, incubados a 37°C, sob agitação em banho Maria. Nos tempos 0, 30 min, e posteriormente, a cada hora durante 8 h e finalmente a 24 h, foram retiradas alíquotas das amostras, para acompanhamento da evolução da reação de hidrólise. O grau de hidrólise foi verificado por meio da quantificação do teor de ácidos graxos livres, utilizando método titulométrico.

**Tabela 9.** Níveis codificados e reais de pH, concentração de enzima e volume de goma arábica a 7%, utilizados para verificar o grau de hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente industrial.

Variável	Nível				
	- $\alpha$	-1	0	1	+ $\alpha$
pH	7,16	7,50	8,00	8,50	8,84
Concentração de enzima (g.mL <sup>-1</sup> )	0,013	0,040	0,080	0,120	0,147
Goma arábica 7% (mL)	0,00	1,21	3,00	4,79	6,00

$\alpha=1,68$ .

Para otimizar a hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente pela lipase comercial (Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia*) foi proposto novo delineamento

central composto rotacional. As variáveis foram as mesmas do delineamento anterior, o pH, a concentração de enzima e o volume de goma arábica a 7%. Entretanto, a faixa de estudo para o pH e concentração de enzima foi deslocada para valores mais próximas das condições obtidas como ótimas e do volume de goma arábica a 7% não foi alterado. As faixas de cada variável e os níveis de variação do delineamento estão apresentadas nas tabelas 10 e 11.

**Tabela 10.** Matriz codificada do delineamento para otimização do grau de hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente industrial em função do pH, da concentração de enzima ([E]) e do volume de goma arábica a 7% (GA 7%).

Ensaio	pH	[E]	GA 7%
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0

**Tabela 11.** Níveis de variação utilizados no delineamento fatorial completo  $2^3$  com quadruplicata no ponto central mais os pontos axiais.

Variável	Nível				
	$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
pH	6,66	7,00	7,50	8,00	8,34
Concentração de enzima ( $\text{g.mL}^{-1}$ )	0,053	0,080	0,120	0,160	0,187
Goma arábica 7% (mL)	0,00	1,21	3,00	4,79	6,00

$\alpha=1,68$ .

As reações foram conduzidas em erlenmeyers com capacidade de 125 mL, incubados a 37°C, sob agitação em banho Maria. Nos tempos 0, 30 min, e posteriormente, a cada hora durante 8 h e finalmente a 24 h, foram retiradas alíquotas das amostras, para acompanhamento da evolução da reação de hidrólise.



O grau de hidrólise foi verificado por meio da quantificação do teor de ácidos graxos livres, utilizando método titulométrico. Após análise da superfície de resposta do delineamento para otimização do grau de hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente industrial foram realizadas três repetições da melhor condição do ensaio para validação do modelo proposto.

#### 4.9.2.2 Avaliação da influência dos processos descontínuo e descontínuo alimentado na hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente industrial pela lipase comercial Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia*

A melhor resposta obtida na otimização do processo de hidrólise dos triacilglicerídeos foi utilizada na avaliação da influência dos processos descontínuo e descontínuo alimentado na degradação do efluente industrial. Nos ensaios descontínuos foram adicionados 10 mL de solução composta por tampão fosfato, goma arábica, enzima comercial BC-ALPS e água destilada e 30 mL do efluente industrial, totalizando 40 mL em cada erlenmeyer. Nos ensaios descontínuos alimentados também foram adicionados de 10 mL solução composta por tampão fosfato, goma arábica, enzima comercial BC-ALPS e água destilada, porém com apenas 40% do volume total do efluente utilizado no regime descontínuo, totalizando 22 mL no início da reação de hidrólise em cada erlenmeyer. Os outros 60% do volume total do efluente foram adicionados gradativamente em volumes de 3 mL durante as seis primeiras horas da reação.

As reações foram conduzidas em erlenmeyers com capacidade de 125 mL, incubados a 37°C, sob agitação em banho Maria. Nos tempos 0, 30 min, e posteriormente, a cada hora durante 8 h e finalmente no tempo 24 h, foram retiradas alíquotas das amostras, para acompanhamento da evolução da reação de hidrólise. O grau de hidrólise foi verificado por meio da quantificação do teor de ácidos graxos livres, utilizando método titulométrico conforme já descrito.

A avaliação da influência dos processos descontínuo e descontínuo alimentado foi realizada em três repetições e a análise da atividade hidrolítica em triplicata. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

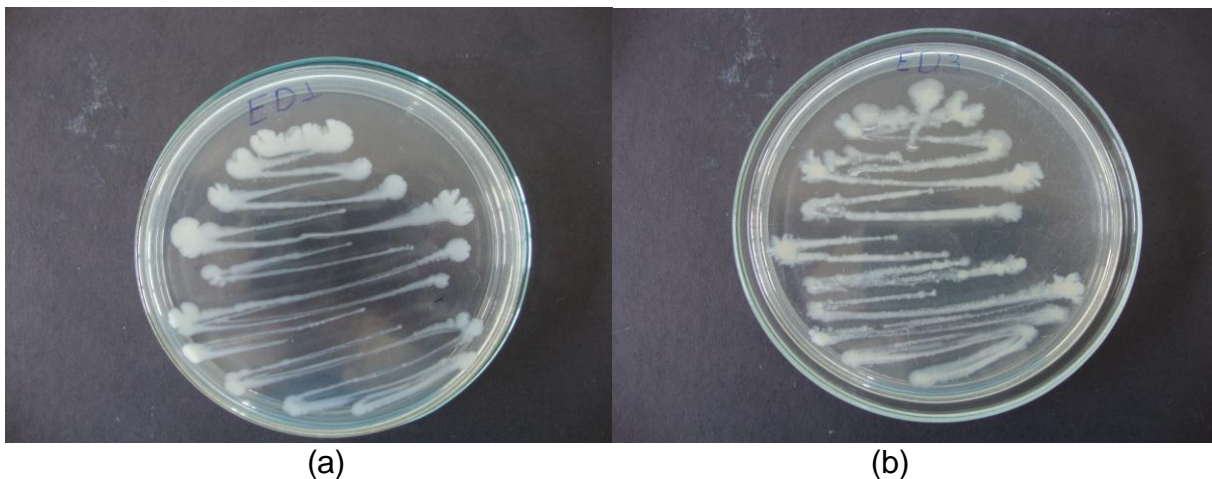
As médias das análises dos ensaios de pré-seleção em meio sólido, seleção em meio líquido e influência dos processos descontínuo e descontínuo alimentado foram analisadas estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância e calculados os desvios-padrão pelo programa Microsoft Office Excel, versão 7.0. As respostas obtidas em delineamento exploratório fracionário foram analisadas no programa *Statistica*, versão 7.0 (STATISTICA FOR WINDOWS, 2004; EXCEL FOR WINDOWS, 2009).

As respostas de cada delineamento central composto rotacional foram analisadas no programa *Statistica*, versão 7.0 e SAS, versão 6.11 (STATISTICA FOR WINDOWS, 2004; THE SAS SYSTEM, 1992, respectivamente). Foram gerados gráficos de Pareto e posteriormente, modelos de regressão múltipla, ajustados pela eliminação de termos não significativos, que geraram gráficos de superfície de resposta e curva de nível. Verificou-se a significância dos modelos e a falta de ajuste pelos coeficientes de regressão e variação.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SCREENING

A partir dos meios estudados para isolamento das cepas, vinte e nove microrganismos foram selecionados para avaliação do potencial de produção de lipase, sendo que vinte e quatro deles foram isolados do efluente proveniente da empresa Micos Cicopal Ltda., e cinco da Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) de Goiânia. A codificação usada para os microrganismos isolados foi: IEA1 e IEA2 (efluente industrial, tanque de entrada, meio PCA, microrganismo 1 e 2); IEB1 a IEB4 (efluente industrial, esporos misto de bactérias e lipases, meio PCA, microrganismo 1 a 4); IEV1 e IEV2 (efluente industrial, esporos misto de bactérias e lipases, meio VRBA, microrganismo 1 e 2); ITEA1 e ITEA2 (efluente industrial, tanque de equalização, meio PCA, microrganismo 1 e 2); ITEB1 a ITEB4 (efluente industrial, tanque de equalização, meio AB, microrganismo 1 a 4); ITEV1 e ITEV2 (efluente industrial, tanque de equalização, meio VRBA, microrganismo 1 e 2); ITA1 e ITA2 (efluente industrial, tanque de tratamento, meio PCA, microrganismo 1 e 2); ITB1 a ITB4 (efluente industrial, tanque de tratamento, meio AB, microrganismo 1 a 4); TV1 e TV2 (tanque de tratamento, meio VRBA, microrganismo 1 e 2); ETDB1 a ETDB5 (efluente da ETE, tanque de decantação, meio AB, microrganismo 1 a 5). Na figura 8 são mostrados dois dos microrganismos isolados dos efluentes coletados.

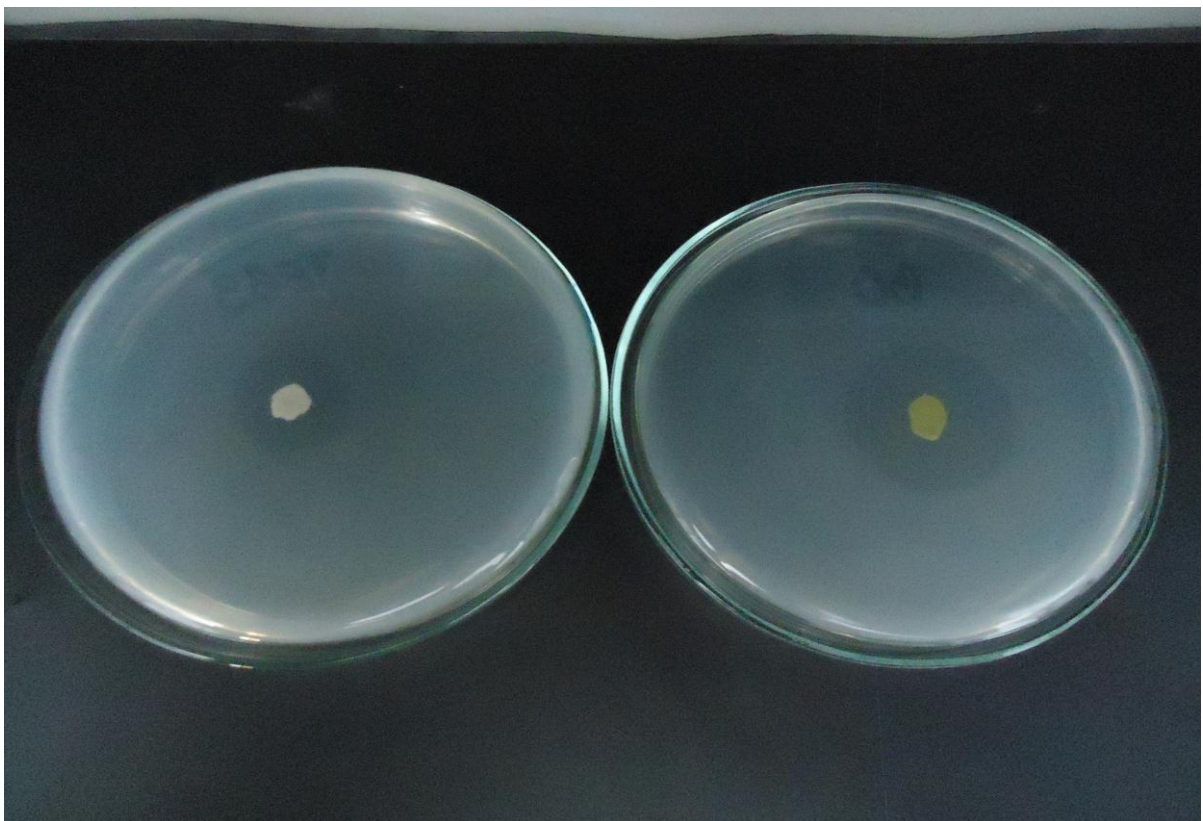


**Figura 8.** Microrganismos isolados dos efluentes ETDB1(a) e ETDB5 (b).

## 5.2 SELEÇÃO DAS CEPAS PRODUTORAS DE LIPASE

### 5.2.1 Cultivo em meio sólido

Foram avaliadas de quarenta microrganismos (29 isolados de efluentes industriais e 11 adquiridos de institutos de pesquisa) a atividade lipolítica no cultivo em meio sólido, destes, trinta e nove apresentaram halo ao redor das colônias, evidenciando a reação de degradação da tributirina por enzimas extracelulares. A tributirina presente no meio sólido, provavelmente induziu a produção de lipase, atuando como substrato para a reação enzimática. Freire (1996), estudando a capacidade de microrganismos lipolíticos, também pré-selecionou microrganismos em meio sólido, escolhendo apenas as cepas que apresentaram maiores halos para posteriores estudos. Na figura 9 pode ser observada a diferença do raio de hidrólise da lipase do microrganismo TEB3 (esquerda) isolado de efluente, com o raio da cepa de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 (direita) doada pela Fundação Tropical André Toselho – Campinas, São Paulo, Brasil.



**Figura 9.** Halo lipolítico formado pela lipase do microrganismo ITEB3 (esquerda) e da cepa de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 (direita).

Conforme pode ser observado no apêndice A, dos quarenta microrganismos estudados, trinta e nove evidenciaram reação lipolítica em meio sólido, e destes quatro foram pré-selecionados por apresentarem halo de lipólise (R) em relação ao raio da colônia (r) maior que 2,0 (Tabela 12). O parâmetro de escolha R/r é bastante variável, não havendo padronização. No presente trabalho, foi estabelecido que os quatro microrganismos que apresentassem maior R/r seriam selecionados, assim, após análise dos resultados determinou-se  $R/r > 2,0$ . Colen, Junqueira e Moraes-Santos (2005), estudando a capacidade lipolítica de fungos do solo brasileiro, empregaram a relação  $R/r > 1,2$ , considerando as cepas que apresentaram essa relação as mais promissoras. Goldbeck (2008), selecionando leveduras produtoras de lipase, estudou trezentas e setenta e duas cepas silvestres, isoladas de diferentes regiões do Brasil. Após análise qualitativa em meio sólido contendo tributirina, pré-selecionou quarenta e quatro das trezentas e setenta e duas cepas de leveduras silvestres, isoladas de diferentes regiões do país, para selecionar os microrganismos potenciais para a produção de lipase.

**Tabela 12.** Avaliação do potencial da produção de lipase a partir da medida do halo de lipólise em meio de cultivo sólido com tributirina dos microrganismos pré-selecionados.

Microrganismo	Raio (mm)		R/r
	Colônia (r)	Halo lipolítico (R)	
<i>Corynebac glutamil</i>	3,3 ± 0,08	7,0 ± 0,13	2,10 <sup>b</sup>
<i>Penicillium lanosum</i> NRRL 3442	3,3 ± 0,05	7,2 ± 0,07	2,15 <sup>b</sup>
<i>Bacillus sp.</i> NRRL 41094	3,3 ± 0,05	7,6 ± 0,08	2,30 <sup>b</sup>
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416	2,4 ± 0,05	9,1 ± 0,05	3,76 <sup>a</sup>

Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na produção de lipase entre os microrganismos em estudo.

Observou-se também que os melhores resultados de relação R/r foram dos microrganismos adquiridos em institutos de pesquisa, a *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, *Bacillus sp.* NRRL 41094, *Penicillium lanosum* NRRL 3442 e *Corynebac glutamil*, pois nenhum dos microrganismos isolados dos efluentes apresentou relação  $R/r > 2,0$  (Apêndice A), o que sugere que os mesmos tiveram baixa produção de enzimas lipolíticas extracelulares.

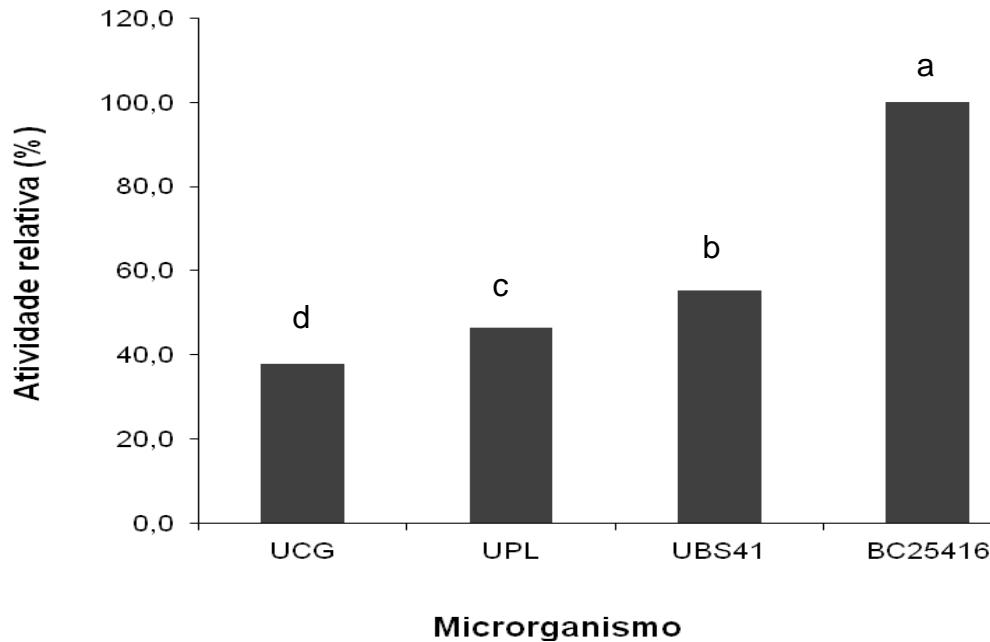
Entre os microrganismos pré-selecionados ocorreu uma variação de 23,1% nos halos de hidrólise, sendo a cepa BC25416 (*Burkholderia cepacia* ATCC 25416), a que apresentou a maior relação R/r, sendo estatisticamente significativa

( $p \leq 0,05$ ) sua diferença quando comparada aos demais resultados. A diferença de intensidade entre os halos se deve à quantidade de lipase extracelular secretada pelo microrganismo (CARDENAS et al., 2001). Griebeler et al. (2009), estudando a capacidade de produção de enzimas lipolíticas de diferentes microrganismos, em meio sólido contendo tributirina como indutor, obtiveram para a cepa *Penicillium sp.* o maior halo de hidrólise (raio), de 9,35 mm após 3 dias de incubação, mostrando bom potencial para produção de lipase. Resultado apenas 2,8% maior ao do presente trabalho, encontrado para a *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 após dois dias de incubação. Estudo realizado por Castiglioni (2009) também mostrou o potencial de produção de lipase extracelular da *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, além da síntese de biodiesel ter sido promissora, quando comparados às lipases dos demais microrganismos estudados.

Apesar de nenhum dos microrganismos isolados dos efluentes terem sido selecionados para a fermentação em meio de cultivo líquido, foi possível confirmar que microrganismos produtores de lipase podem ser encontrados em diversos *habitats*, principalmente se houver presença de lipídios. Pois vários *habitats* ricos em lipídeos têm sido utilizados para isolamento e seleção de microrganismos produtores de lipase, como os resíduos industriais provenientes do processamento de óleos vegetais, laticínios e frigoríficos, de solo contaminado com óleo, de oleaginosas, de alimentos em decomposição, de pilhas de compostagem e outros (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

### 5.2.2 Fermentação em meio líquido

Após a pré-seleção dos microrganismos *Corynebacterium glutamicum* (UCG), *Penicillium lanosum* NRRL 3442 (UPL), *Bacillus sp.* NRRL 41094 (UBS41) e *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 (BC25416) em meio sólido, foi realizada a fermentação em meio líquido para selecionar o microrganismo com maior produção da enzima. O óleo de soja fez parte do meio de cultivo para induzir a produção de lipase extracelular durante 72 h de incubação. A figura 10 apresenta o gráfico da atividade enzimática relativa dos microrganismos *Corynebacterium glutamicum* (UCG), *Penicillium lanosum* NRRL 3442 (UPL), *Bacillus sp.* NRRL 41094 (UBS41) e *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 (BC25416), tendo como substrato o p-nitrofenolpalmitato.



**Figura 10.** Atividade enzimática relativa dos microrganismos pré-selecionados, após cultivo em meio líquido, tendo como substrato o p-nitrofenolpalmitato.

Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os microrganismos pré-selecionados; UCG: *Corynebac glutamil*; UPL: *Penicillium lanosum* NRRL 3442; UBS41: *Bacillus sp* NRRL 41094; BC25416: *Burkholderia cepacia* ATCC 25416.

Os gêneros dos microrganismos pré-selecionados influenciaram significativamente ( $p \leq 0,05$ ) a reação enzimática de degradação do p-nitrofenolpalmitato. Entre os microrganismos, que diferiram entre si, a menor atividade foi de  $0,0022 \text{ U.mL}^{-1}$ , referente à lipase do *Corynebac glutamil* (UCG), que apresentou 62% menos atividade que a lipase da *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 (BC25416). As atividades enzimáticas dos microrganismos *Bacillus sp*. NRRL 41094 (UBS41) de  $0,0032 \text{ U.mL}^{-1}$  e *Penicillium lanosum* NRRL 3442 (UPL) de  $0,0027 \text{ U.mL}^{-1}$  foram 45 e 53% menores que a máxima atividade encontrada no presente estudo.

Estes resultados confirmam os obtidos na análise em meio sólido, contendo tributirina como substrato, uma vez que a maior atividade também foi encontrada para o microrganismo *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, seguida do *Bacillus sp* NRRL 41094, *Penicillium lanosum* NRRL 3442 e *Corynebac glutamil*. Portanto, a cepa de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 foi selecionada para otimização da produção de lipase e posterior aplicação no efluente industrial.

Os gêneros dos microrganismos *Burkholderia*, *Bacillus* e *Penicillium*, têm sido bastante estudados para produção de lipases extracelulares, com intuito de otimizar a produção da enzima para as mais diversas aplicações. Castiglioni (2009) selecionou cepas produtoras de lipase para síntese de biodiesel e encontrou para a *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 atividade hidrolítica de 0,14 U.mL<sup>-1</sup>. Wolski et al. (2009), compararam a produção de lipase do *Penicillium sp.* em fermentação sólida e submersa e determinaram a maior produção e atividade da lipase a 42°C, de 15,17 U.mL<sup>-1</sup>. Annamalai et al. (2011) estudaram a produção da lipase termoestável de *Bacillus licheniformis*, isolada de ambiente marinho, usando como substrato o óleo de amendoim e relataram atividade hidrolítica de 730 U.mL<sup>-1</sup>, após 48 h de incubação a 55°C. Assim, observou-se grande variação entre os resultados obtidos no presente trabalho com os reportados na literatura, provavelmente, em função dos meios de cultivo, dos métodos de determinação da atividade enzimática e dos microrganismos utilizados.

### 5.3 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Burkholderia cepacia*

Após a seleção da lipase da *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 pelos critérios já apontados, foi iniciado o estudo visando aumentar a produção da lipase. Primeiramente, foi realizado delineamento exploratório para estimar os efeitos dos nutrientes mais relevantes no estímulo a produção de lipase. Para tanto, foi avaliado o efeito da concentração de água de maceração de milho (AMM), óleo de soja (OS) e fontes de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), magnésio (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e nitrato (NaNO<sub>3</sub>). A resposta foi verificada em termos de atividade enzimática, pois esta é diretamente proporcional à produção de enzimas extracelulares. As respostas obtidas no delineamento estão apresentadas na tabela 13. Os valores de atividade enzimática variaram de 0 a 0,0181 U.mL<sup>-1</sup>. Por meio da análise dos efeitos das variáveis sobre a resposta atividade enzimática (Apêndice B e C), foi verificado que apenas o parâmetro nitrato de sódio foi estatisticamente significativo (p=0,0463).

Para facilitar a verificação do quanto o efeito de cada variável influenciou a produção de lipase, foi elaborado o diagrama de Pareto (Figura 11). Este gráfico ilustrou a influência das variáveis na produção da lipase, em intervalo de confiança de 95%. A magnitude de cada efeito foi indicada pelas barras horizontais, enquanto



que a linha transversal às barras horizontais representou a magnitude dos efeitos estatisticamente significativos ao nível de  $p=0,05$ .

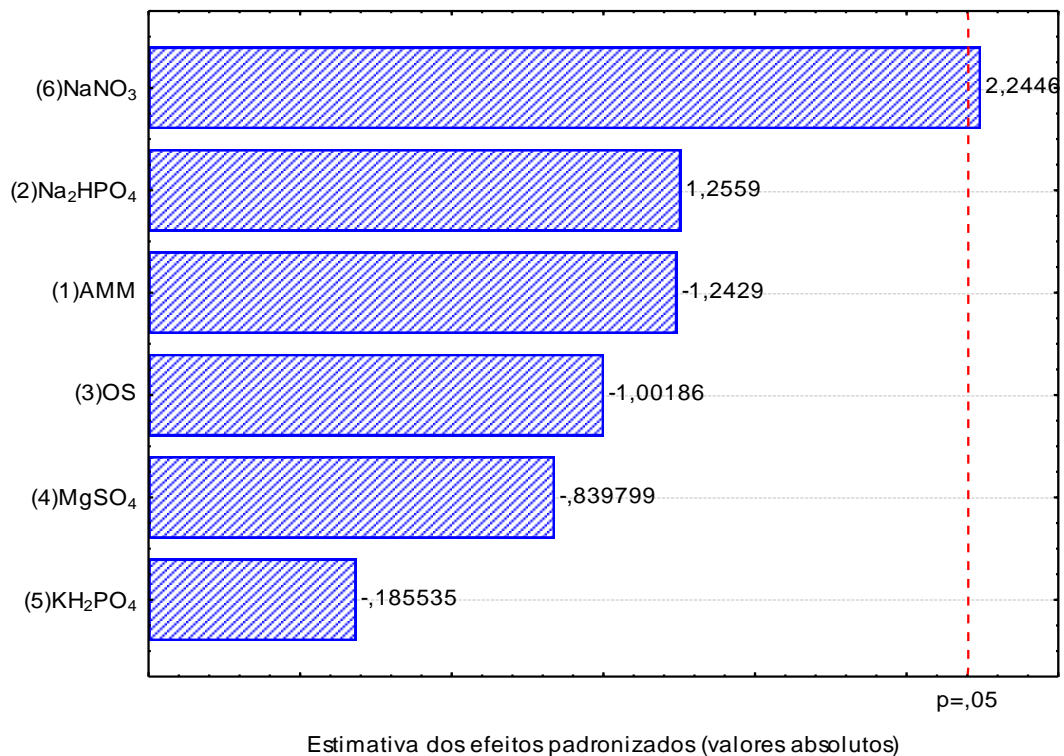
**Tabela 13.** Atividade enzimática da lipase de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 com diferentes nutrientes adicionados ao meio (níveis codificados).

Ensaio	AMM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	OS	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaNO <sub>3</sub>	Atividade enzimática (U.mL <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,0029
2	1	-1	-1	-1	1	-1	0,0023
3	-1	1	-1	-1	1	1	0,0181
4	1	1	-1	-1	-1	1	0,0090
5	-1	-1	1	-1	1	1	0,0089
6	1	-1	1	-1	-1	1	0,0022
7	-1	1	1	-1	-1	-1	0,0000
8	1	1	1	-1	1	-1	0,0080
9	-1	-1	-1	1	-1	1	0,0113
10	1	-1	-1	1	1	1	0,0017
11	-1	1	-1	1	1	-1	0,0012
12	1	1	-1	1	-1	-1	0,0063
13	-1	-1	1	1	1	-1	0,0011
14	1	-1	1	1	-1	-1	0,0025
15	-1	1	1	1	-1	1	0,0114
16	1	1	1	1	1	1	0,0011
17	0	0	0	0	0	0	0,0036
18	0	0	0	0	0	0	0,0034

AMM: água de maceração de milho; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: fosfato monobásico de sódio; OS: óleo de soja; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: sulfato de magnésio heptahidratado; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: fosfato dibásico de potássio; NaNO<sub>3</sub>: nitrato de sódio.

O teor de nitrato de sódio apresentou efeito positivo sobre a atividade enzimática (Figura 11). O aumento na concentração de nitrato de sódio de 0 para 6 g.L<sup>-1</sup> acarretou aumento da resposta, indicando que quanto maior a quantidade desse sal no meio reacional, maior a produção de lipase extracelular de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, e conseqüentemente, maior atividade enzimática obtida. Geralmente, os microrganismos proporcionam rendimentos elevados de lipase quando se utiliza fontes de nitrogênio orgânico (SUPAKDAMRONGKUL; BHUMIRATANA; WIWAT, 2010), porém neste experimento o estímulo foi proveniente de fonte inorgânica. O íon Na<sup>+</sup> teve efeito positivo e significativo apenas quando foi utilizado o sal nitrato de sódio. Para o fosfato monobásico de sódio verificou-se efeito positivo, porém não significativo ( $p=0,2352$ ).

A adição de fontes de nitrogênio orgânico (água de maceração de milho,  $p=0,2398$ ), carbono (óleo de soja,  $p=0,3379$ ) e das fontes de magnésio ( $p=0,4189$ ) e potássio ( $p=0,8562$ ) não obtiveram efeitos significativos sobre a produção da lipase (Apêndice C). Contudo, estes efeitos apresentaram sinal negativo, indicando que o aumento na concentração desses nutrientes apontou pequena tendência à menor atividade enzimática e que poderia resultar em diminuição da produção de lipases extracelulares.



**Figura 11.** Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados dos diferentes nutrientes adicionados ao meio de cultivo sobre a resposta atividade enzimática da lipase de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416.

O uso de triacilglicerídeos como fonte de carbono é importante, pois favorece tanto o crescimento celular, quanto a produção de enzimas. Nesse sentido, vários óleos vegetais, como o de soja, de milho, de girassol, de oliva, de palma e de algodão, entre outros, são citados como indutores da produção de lipase, sendo utilizados pelos microrganismos como fonte de carbono no meio reacional (PAQUES; MACEDO, 2006). Contudo, no presente trabalho este fenômeno não foi observado, haja vista que a concentração de óleo de soja não foi estatisticamente

significativa na produção de lipases extracelulares de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416.

A indução de produção de lipases parece estar relacionada não só ao comprimento das cadeias carbônicas dos ácidos graxos nos triacilglicerídeos e ao número de insaturações, mas também pela forma de agitação e concentração do substrato utilizado. A agitação ideal é a do tipo orbital e em alta velocidade, pois favorece a interação da lipase ao substrato na interface óleo-água. Este efeito parece estar relacionado com a melhoria das condições de transferência de massa no fermentador. A disponibilidade do lipídeo para o consumo microbiano é favorecida pela turbulência no meio, resultando em maior e mais rápido crescimento das células e conseqüentemente da produção de lipase (FREIRE et al., 1997; LIMA et al., 2003). Entretanto, dada às condições laboratoriais, a agitação dos experimentos foi realizada com agitação do tipo horizontal recíproco, o que pode ter influenciado nos resultados obtidos. A concentração de óleo utilizada (4 a 12%) foi elevada quando comparada ao estudo realizado por Lima et al. (2003), que analisaram o efeito da concentração de óleo de oliva, de 0,5, 1,5 e 2%, como fonte de carbono, na produção de lipase pelo fungo *Penicillium aurantiogriseum*. Estes autores verificaram que com o aumento na concentração de óleo de oliva houve diminuição da atividade enzimática, sendo a maior atividade obtida para a concentração de 0,5% de óleo de oliva.

Da mesma maneira, Turki et al. (2010) estudaram a otimização da produção de lipase extracelular da levedura *Yarrowia lipolytica* e observaram que em concentrações maiores de substrato lipídico metil oleato (2%) houve menor atividade da enzima. A menor atividade da enzima observada em concentrações mais elevadas de lipídios é explicada por alguns autores como uma inibição da enzima pelos ácidos graxos livres do meio reacional. Esse efeito, entretanto, ainda não foi devidamente caracterizado (FREIRE et al., 1997). Outra hipótese para explicar este fenômeno, se refere à redução da síntese de lipases em maiores concentrações de óleo de oliva, devido à transferência mais pobre de oxigênio ao meio, uma vez que suprimentos baixos de oxigênio poderiam diminuir o metabolismo dos microrganismos e, conseqüentemente, a produção de lipases (ELIBOL; ÖZER, 2000).

Os íons potássio e magnésio são compostos de grande importância para o metabolismo de microrganismos, pois dependendo de sua concentração podem

atuar favorecendo ou inibindo determinadas rotas (CASTIGLIONI; 2009). No trabalho de Ramani et al. (2010), a adição de fontes de nitrogênio e íons metálicos, como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Mg}^{+2}$ , para produção de lipase de *Pseudomonas gessardii*, também não resultou em aumento da produção de lipase. Provavelmente, a fonte de nitrogênio orgânica estimulou a liberação de proteases no meio reacional, desnaturando as lipases produzidas no meio ou sendo tóxica para a bactéria, inibindo a produção da enzima de interesse. Entretanto, Gaur, Gupta e Khare (2008), estudando a produção da lipase de *Pseudomonas aeruginosa*, observaram que a produção de enzimas foi estimulada na presença de íons  $\text{Mg}^{+2}$ . Supakdamrongkul, Bhumiratana e Wiwat (2010) verificaram que a produção de lipase do fungo *Nomuraea rileyi* MJ também foi estimulada pelo  $\text{Na}^+$ , com indícios de que a fonte de nitrogênio inorgânico favoreceu a produção da enzima. Diferentes resultados obtidos, considerando esse íon metálico, podem ser decorrentes da interação íon-enzima. A ação de íons no meio reacional pode ser descrita, por meio de dois mecanismos, o primeiro sugere a ação direta do íon no sítio catalítico enzimático, como acontece com muitas enzimas, e o segundo, a ação indireta do íon, resultando na formação de complexos com ácidos graxos ionizados, que ocasiona mudanças na solubilidade e no comportamento do íon na interface do meio reacional (LEE; RHEE, 1993).

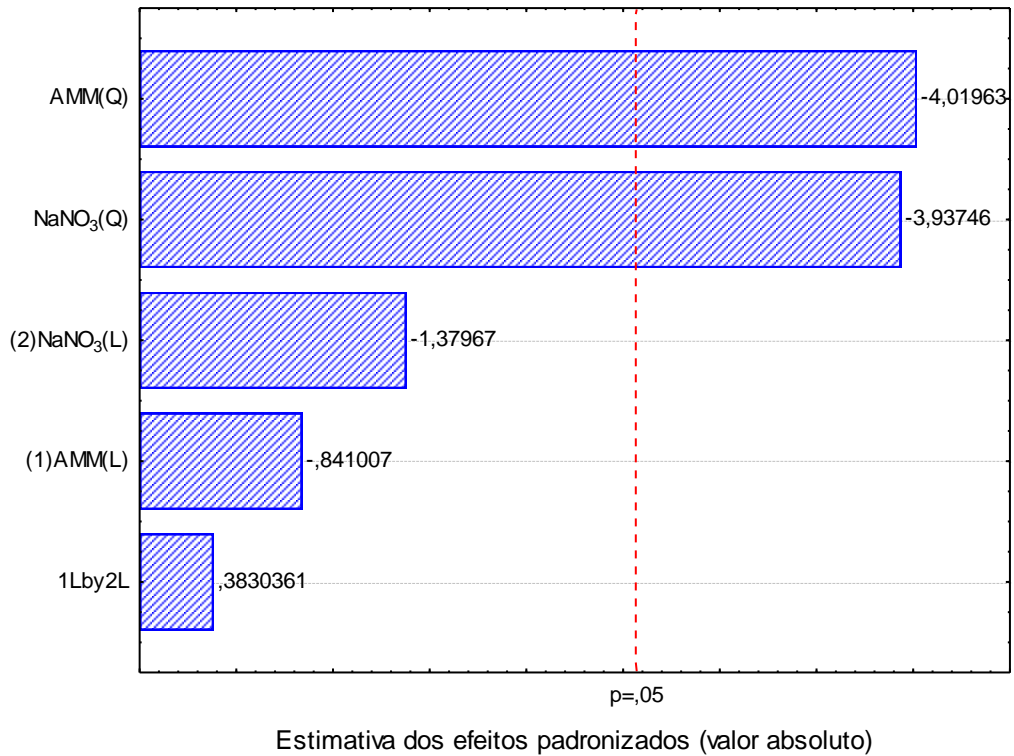
De todas as substâncias testadas, apenas o nitrato de sódio foi significativo para a produção de lipase. Entretanto, optou-se por selecionar mais uma variável, para que ambas fossem estudadas em novo delineamento. A princípio, a escolha seria baseada na análise da substância que apresentasse menor significância na produção de lipase. As substâncias que apresentaram os menores valores de p foram o fosfato monobásico de sódio ( $p=0,2352$ ) e a água de maceração de milho ( $p=0,2398$ ). Contudo, apesar do fosfato monobásico de sódio ter apresentado efeito positivo e com valor de p menor, optou-se por selecionar a água de maceração de milho para a próxima etapa da pesquisa. Esta escolha se justifica em função da água de maceração de milho ser um subproduto da indústria alimentícia, rico em nutrientes como carboidratos, aminoácidos, peptídeos, vitaminas e minerais, principalmente fosfatos, o que poderia reduzir custos do meio de cultura e favorecer o aumento da produção de lipase de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. O nitrato de sódio tem a vantagem de ser fonte tanto de nitrogênio quanto de sódio, fato que também justifica a não utilização do fosfato monobásico de sódio como fonte de íon  $\text{Na}^+$ .

Para otimizar a produção de lipase de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, os teores de nitrato de sódio estudados foram deslocados para a faixa entre 1 e 5 g.L<sup>-1</sup>, enquanto que a água de maceração de milho para a faixa de 10 a 30 g.L<sup>-1</sup>, conforme tendência indicada no ensaio anterior. O delineamento completo e os efeitos do teor de água de maceração de milho e nitrato de sódio sobre a resposta atividade enzimática estão apresentados na tabela 14 e na figura 12, respectivamente.

**Tabela 14.** Atividade enzimática da lipase de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 em função do enriquecimento do meio de cultivo com água de maceração de milho (AMM) e nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>).

Ensaio	AMM	NaNO <sub>3</sub>	Atividade enzimática (U.mL <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	0,0068
2	1	-1	0,0063
3	-1	1	0,0025
4	1	1	0,0034
5	0	0	0,0110
6	0	0	0,0103
7	0	0	0,0089
8	-1,4142	0	0,0056
9	0	1,4142	0,0044
10	1,4142	0	0,0024
11	0	-1,4142	0,0039

Os efeitos quadráticos do nitrato de sódio ( $p=0,0110$ ) e da água de maceração de milho ( $p=0,0101$ ) foram significativos (Apêndice D). Enquanto os efeitos lineares e de interação não foram significativos. Observando-se o diagrama de Pareto, infere-se que ambos nutrientes, produziram efeito negativo nas respostas da atividade enzimática, isto é, o aumento na concentração de nitrato de sódio e água de maceração de milho proporcionam diminuição na produção de enzimas extracelulares pela *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 (Figura 12). O efeito significativo das concentrações desses nutrientes foi quadrático, indicando que houve aumento na produção de enzimas até atingir um ponto de máximo e depois essa produção diminuiu.



**Figura 12.** Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados do nitrato de sódio e da água de maceração de milho adicionados ao meio de cultivo sobre a resposta atividade enzimática da lipase de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416.

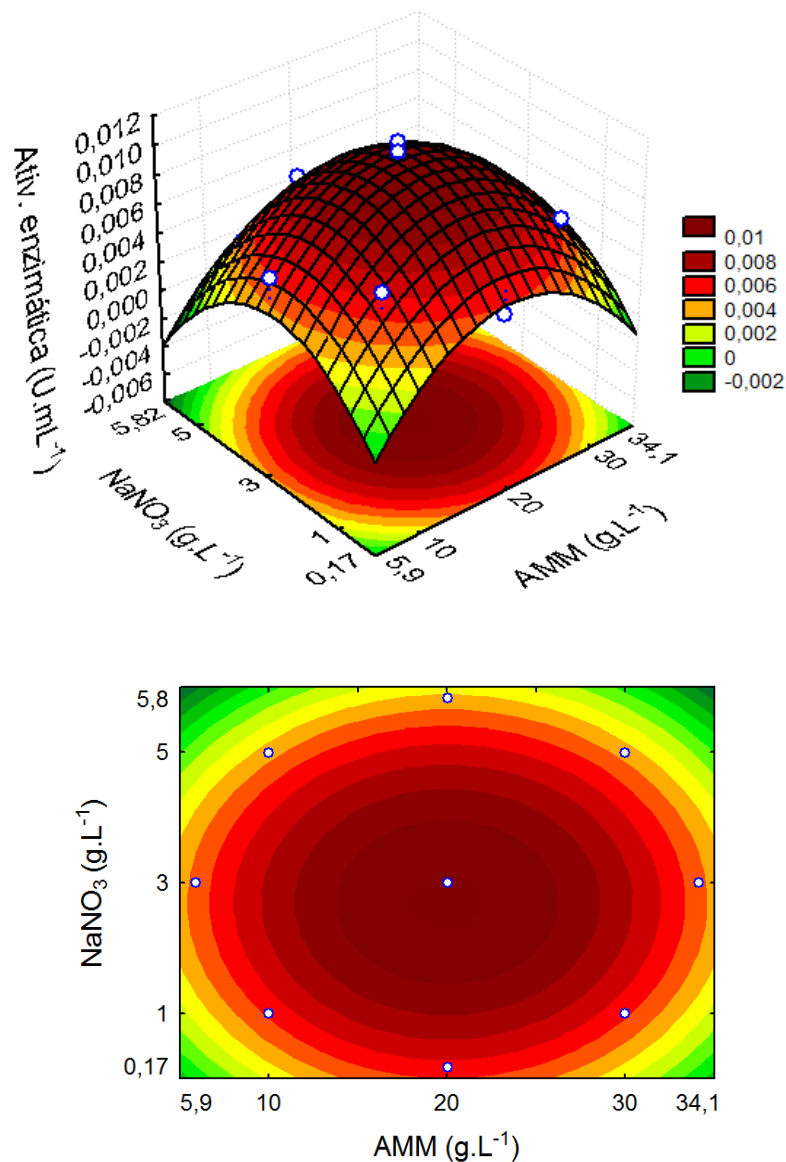
A partir da estimativa do efeito de cada nutriente foi gerado um modelo matemático significativo ( $p=0,0425$ ), com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,8459 e falta de ajuste não significativa ( $FA=0,2327$ ). Entretanto, o coeficiente de variação foi alto (28,23%). Fato que torna o modelo adequado apenas para verificar a tendência da resposta e não para ser usado para fins preditivos. Assim, fez-se o ajuste do modelo completo. Entretanto, após ajuste do modelo, a remoção do termo linear nitrato de sódio ( $p=0,1751$ ) conferiu coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{aj}$ ) menor. Assim, o mesmo foi mantido no modelo ajustado. O termo linear água de maceração de milho e a interação água de maceração de milho com nitrato de sódio foram desconsiderados. O modelo ajustado apresentou coeficiente de determinação de 0,8183 e coeficiente de determinação ajustado de 0,7405. A análise de variância com os termos da equação, após o ajuste do modelo, estão apresentados no apêndice E.

Para a atividade enzimática obteve-se modelo matemático de segunda ordem. A equação 6 representa o modelo da atividade enzimática (AE) em função da

concentração de AMM ( $X_1$ ) e  $\text{NaNO}_3$  ( $X_2$ ). Os termos destacados em negrito referem-se as variáveis estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

$$AE = \mathbf{0,01007} - \mathbf{0,002864X_1^2} - 0,000826X_2 - \mathbf{0,002806X_2^2} \quad (\text{Eq. 6})$$

Após o estabelecimento do modelo ajustado, com intuito de melhorar a visualização das variações da atividade da lipase de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 em função dos teores de água de maceração de milho e nitrato de sódio, foram construídos gráficos de superfície de resposta e de curvas de contorno (Figura 13).



**Figura 13.** Superfície de resposta e curvas de contorno para a atividade de lipase de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 em função das concentrações de água de maceração de milho e nitrato de sódio.

Verificou-se que a otimização da reação enzimática foi obtida, sendo a faixa ótima observada para as concentrações de aproximadamente 13,8 a 26,2 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho e de 1,5 a 3,9 g.L<sup>-1</sup> de nitrato de sódio, com resposta máxima para a atividade enzimática de 0,0100 U.mL<sup>-1</sup>. Portanto, obedecendo à faixa maximizada da curva de nível, é possível a combinação de diferentes concentrações da água de maceração de milho e do nitrato de sódio, para a obtenção da atividade máxima da lipase de *Burkholderia cepacia* ATCC2516. Fato que possibilita a redução dos custos do meio de cultivo, dada à menor quantidade de nitrato de sódio que poderá ser utilizada industrialmente.

A menor atividade encontrada (0,0040 U.mL<sup>-1</sup>) pelo modelo, apresentou resposta 60% menor que a atividade máxima obtida, encontrada quando utilizou-se concentração de nitrato de sódio maior que 5 g.L<sup>-1</sup> e menores que 0,17 g.L<sup>-1</sup>. O nitrogênio é um nutriente essencial para a produção de enzimas, visto estas serem constituídas de aminoácidos, que apresentam nitrogênio na sua estrutura (ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010). Nesse sentido, tanto o nitrato de sódio como a água de maceração forneceram nitrogênio aos microrganismos na produção de lipases. O fato das concentrações intermediárias desses compostos proporcionarem maior produção de lipases, provavelmente, foi consequência do balanço entre a concentração de carbono e nitrogênio no meio, geralmente, a concentração de carbono deve ser maior que a de nitrogênio para favorecer as necessidades fisiológicas dos microrganismos para a biossíntese de lipase (FREIRE 1997).

Fontes de nitrogênio complexas, como o extrato de leveduras, as peptonas, o farelo de soja e a água de maceração de milho, têm sido tradicionalmente utilizadas na produção de lipase (LIMA et al., 2003). A vantagem da utilização da água de maceração de milho está no fato deste resíduo industrial ser riquíssimo em nutrientes que podem ser utilizados pelos microrganismos para produção de enzimas, portanto, sua utilização é uma alternativa para diminuir os custos de meios de cultura para produção de enzimas. Chahinian et al. (2000) utilizaram água de maceração de milho como fonte de nitrogênio, para obtenção de lipases a partir do cultivo de *Penicillium cyclopium* e obtiveram bons resultados na produção de lipase do tipo I, produzida na presença de triacilglicerídeos. A atividade enzimática foi de 110 U.mL<sup>-1</sup>, enquanto que para a lipase do tipo II, específica para glicerídeos parciais foi de 10 U.mL<sup>-1</sup>. Estes valores são mais altos que os obtidos no presente trabalho e podem ser justificados pelas diferenças entre as metodologias,



microrganismos e condições de cultivo utilizados. Apesar da tentativa de padronização internacional, a atividade enzimática das preparações é específica de cada pesquisador, produtor ou comerciante. As enzimas exigem temperaturas e pH diferentes, dificultando a comparação das atividades enzimáticas, além da variedade de metodologias e adaptações que elevam o grau de dificuldade das comparações de resultados de diferentes estudos (SOUTO, 2011).

O nitrato de sódio, utilizado como fonte de nitrogênio e sódio, também tem sido estudado como fonte de nutriente por outros pesquisadores, devido ter custo menor do que muitas fontes orgânicas, além de evitarem problemas na etapa de purificação de enzimas que podem ocorrer com compostos como extrato de levedura e peptonas (LIMA et al., 2003). Roveda, Hemkemeier e Colla (2010), avaliando a produção de lipases de microrganismos isolados de efluente de laticínios, utilizaram o nitrato de sódio como fonte de nitrogênio na concentração fixa de 0,1% e obtiveram satisfatória atividade lipolítica para fungo do gênero *Aspergillus*. No presente trabalho a concentração de nitrato de sódio utilizada foi três vezes maior e também apresentou efeito positivo na produção de lipase quando presente no meio de cultivo, evidenciando a importância da utilização da fonte de nitrogênio e sódio na produção de enzimas.

A validação do modelo proposto foi realizada em triplicata. Foi testada a atividade enzimática do extrato enzimático da lipase de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 com 20 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho e 3 g.L<sup>-1</sup> de nitrato de sódio, sendo a resposta estimada pelo modelo de 0,0100 U.mL<sup>-1</sup>. A resposta média obtida experimentalmente (AE) foi de 0,0110 U.mL<sup>-1</sup>. A diferença em relação modelo foi de 9,09%, indicando que os resultados experimentais foram pouco ajustados ao modelo proposto, devido ao alto coeficiente de variação (28,23%).

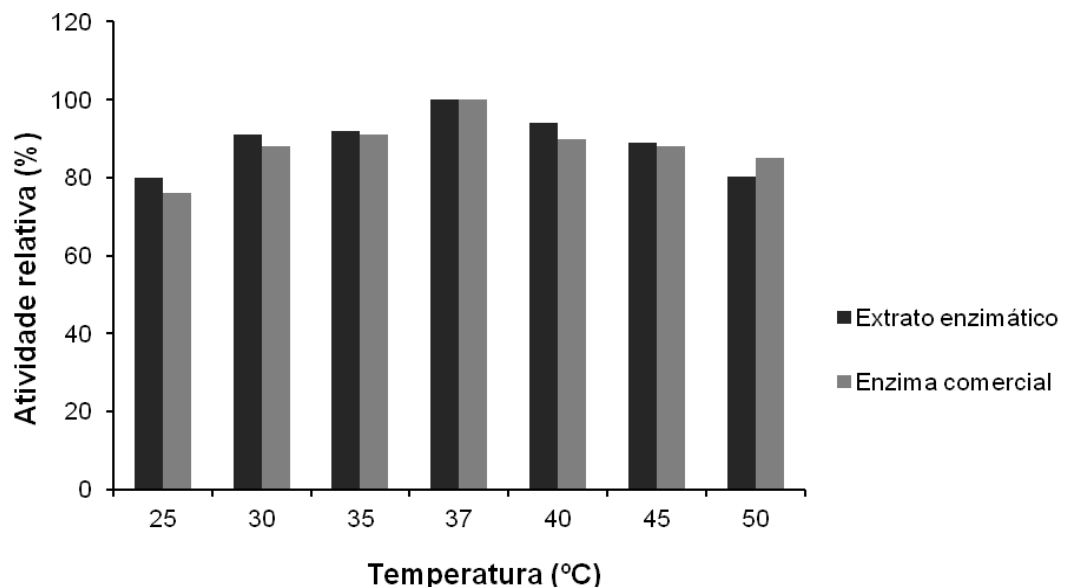
#### 5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA LIPASE

Em processos biocatalisados, o pH e a temperatura são os fatores externos mais importantes, uma vez que, conhecendo os valores ideais, a conformação da lipase não será prejudicada, favorecendo a adsorção no meio reacional, ou seja, na interface óleo-água, o acesso ao sítio ativo da lipase será facilitado, ocasionando a diminuição da energia de ativação da hidrólise do substrato

(RAMANI et al., 2010). Assim, foram caracterizadas as lipases provenientes do extrato enzimático da *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 (BC25416) e da enzima comercial Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia* (BC-ALPS).

#### 5.4.1 Efeito da temperatura na atividade da lipase

O efeito da temperatura na atividade da lipase do extrato enzimático da BC25416 e da enzima comercial BC-ALPS pode ser observado na figura 14. A temperatura ótima das lipases foi de 37°C, onde as atividades foram máximas (100%). A temperatura de 40°C diminuiu a atividade das lipases do extrato enzimático e comercial em apenas 6 e 10%, respectivamente, em relação à temperatura de 37°C. A maior redução da atividade foi de 20% para a lipase do extrato enzimático e de 24% para a lipase comercial, a 25°C, em relação à máxima atividade relativa. De modo geral, todas as temperaturas proporcionaram bom desempenho das lipases, haja vista que, na faixa estudada se obtiveram valores das atividades enzimáticas relativas sempre superiores a 75% da atividade máxima.



**Figura 14.** Efeito da temperatura na atividade relativa das lipases de *Burkholderia cepacia*, na faixa de pH entre 25 a 50°C por 30 minutos.

Castiglioni (2009), estudando as características do extrato enzimático de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 avaliou as temperaturas de 20 a 50°C, pelo método titulométrico, substrato óleo de oliva, pH 8, também relatou a maior atividade

enzimática a 37°C. Nas temperaturas de 40 e 50°C, mais de 83% da atividade foi mantida. Padilha (2010), trabalhando com o mesmo microrganismo, na faixa de 25 a 50°C, também obteve máxima atividade enzimática na temperatura de 37°C. Portanto, a temperatura ótima das lipases neste estudo está de acordo com o reportado na literatura.

Wang, Yu e Xu (2009), também caracterizaram a lipase purificada da *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, contudo, verificaram o efeito da temperatura entre 30 e 80°C, pelo método espectrofotométrico, substrato pNPP, pH 8, em apenas 2 min de reação. De acordo com esses autores, a atividade máxima relativa (100%) ocorreu a 60°C e nas temperaturas de 40 e 50°C, obtendo-se conservação superior a 80% das atividades relativas em relação à atividade máxima. Provavelmente, como a reação de degradação do p-nitrofenolpalmitato pela lipase foi de apenas 2 min, não houve tempo suficiente para ocorrer alteração significativa na estrutura molecular da enzima. Outro possível fator envolvido foi o efeito catalisador da temperatura, que pode ter aumentado a velocidade da reação química. Portanto, esses dois fatores podem ter contribuído para a explicação dos diferentes resultados obtidos, em relação ao presente trabalho.

Wang et al. (2009), caracterizando a lipase purificada de *Burkholderia cepacia* LP08, analisaram a faixa de temperatura de 10 a 60°C, pelo método espectrofotométrico, substrato pNPP, pH 8. A temperatura ótima obtida para a lipase foi de 30°C. A lipase reteve 95% da atividade a 25°C, e a partir da temperatura de 40°C houve acentuada redução da atividade da enzima, principalmente a 60°C, com redução superior a 60% da atividade. Já Jinwal et al. (2003) e Ramani et al. (2010), encontraram a máxima atividade das lipases de *Pseudomonas mendocina* PK-12CS e *Pseudomonas gessardii*, respectivamente, também a 37°C. Ji et al. (2010) caracterizaram a lipase da *Pseudomonas aeruginosa* LX1 para aplicação na produção de biodiesel e encontraram temperatura ótima de 40°C. Observa-se pela tabela 15 que a maioria das lipases do gênero *Pseudomonas* apresenta temperatura ótima próxima de 40°C. Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho são próximos aos reportados em literatura, tanto para cepas de *Burkholderia* como de *Pseudomonas*. Contudo, a temperatura ótima de determinada enzima também pode ser influenciada pela pureza do substrato, pela presença de inibidores e pelo método de análise (LIMA et al., 2004; JI et al., 2010).

A comparação dos resultados obtidos no presente trabalho, com dados referentes ao gênero *Pseudomonas*, é relevante, pois a partir do ano de 1992, com a criação do gênero *Burkholderia*, várias espécies do gênero *Pseudomonas* passaram a ser classificadas como do gênero *Burkholderia*, como exemplo, a cepa de *Pseudomonas cepacia*, que hoje é classificada como *Burkholderia cepacia* (COENYE et al., 2001).

**Tabela 15.** Temperatura ótima de lipases de diferentes microrganismos.

Microrganismo	T ótima (°C)	Microrganismo	T ótima (°C)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LST-03	37	<i>Pseudomonas monteilii</i> TKU009	40
<i>Burkholderia cepacia</i> strain G63	70	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> San-ai	70
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LST-03	35	<i>Pseudomonas fluorescens</i> JCM5963	55
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LST-03	30	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PseA	40
<i>Burkholderia multivorans</i> V2	45	<i>Pseudomonas sp. strain</i> S5	45

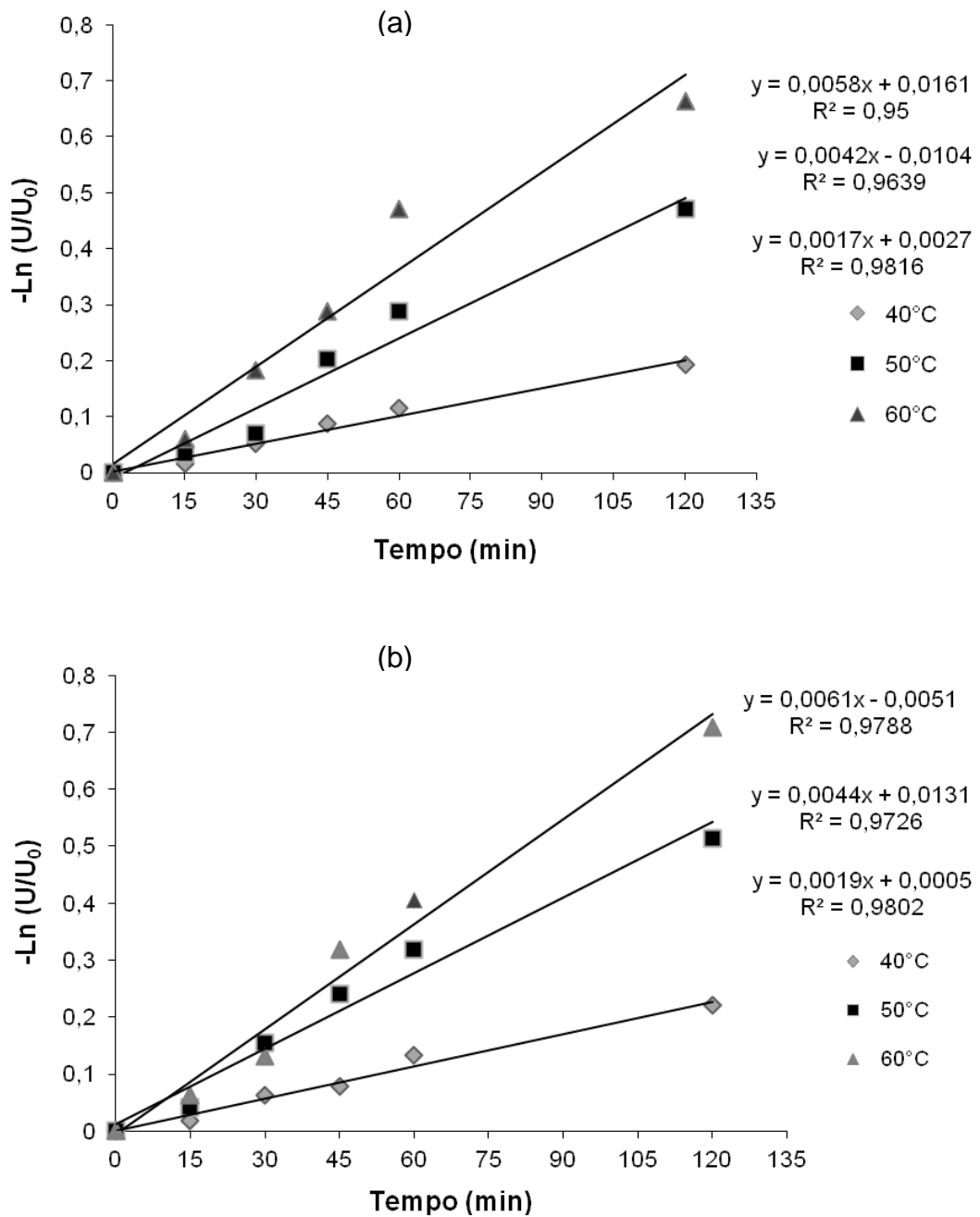
Fonte: Ji et al. (2010).

#### 5.4.2 Estabilidade térmica

As estabilidades térmicas da lipase do extrato enzimático da *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 e da enzima comercial BC-ALPS foram determinadas com base no tempo de meia vida da enzima. Considerou-se que a reação obedecia à cinética de inativação de primeira ordem. As cinéticas de inativação das enzimas em estudo a 40, 50 e 60°C estão expressas na figura 15 (a e b) (Apêndice F).

Como pode ser observado, após 2 h de incubação a 40°C foi mantida 83% da atividade original da lipase do extrato enzimático e 80% da lipase comercial de *Burkholderia cepacia*. Para as temperaturas de 50 e 60°C as atividades relativas foram menores para ambas lipases. Para a lipase do extrato enzimático foi de 58,3% a 50°C e 52% a 60°C e para a lipase comercial de 60 e 49,3%, respectivamente. Enquanto, Castiglioni (2009), para a mesma cepa de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, após igual período de incubação, obteve atividade residual de 55% em relação à atividade máxima nas temperaturas de 50 e 60°C, sendo assim, o

resultado obtido no presente trabalho para a inativação enzimática a 60°C foi superior.



**Figura 15.** Cinética de inativação térmica da lipase do extrato enzimático de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 (a) e da lipase comercial Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia* (b).

Nos estudos de Ji et al. (2010), a lipase da *Pseudomonas aeruginosa* LX1 foi estável a temperatura inferior a 50°C e reteve 64% de sua atividade máxima após incubação a 60°C por 1 h. Para a lipase do extrato enzimático e comercial da

*Burkholderia cepacia*, foram encontrados valores próximos aos relatados por esses autores, de 63 e 66,6%, respectivamente. Além da temperatura, fatores como pH, íons metálicos, pouca rigidez na estrutura da lipase, tempo de incubação, metodologia de análise e substrato também influenciam na estabilidade térmica das enzimas (CARVALHO et al., 2005; PADILHA, 2010; RAMANI, et al., 2010).

A partir das equações da reta obtidas na figura 15, determinou-se as constantes de desnaturação ( $K_d$ ), referentes a cada temperatura analisada, possibilitando o cálculo do tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) das enzimas (Tabela 16).

**Tabela 16.** Constante de desnaturação ( $K_d$ ) e tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) de lipases obtidas sob diferentes temperaturas.

T (°C)	Extrato enzimático		Lipase comercial	
	$K_d$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)	$K_d$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)
40	0,0017	407,734	0,0019	364,814
50	0,0042	165,035	0,0044	157,534
60	0,0058	119,508	0,0061	113,631

Por meio das cinéticas de inativação das lipases do extrato enzimático e da lipase comercial de *Burkholderia cepacia*, além das constantes de desnaturação das enzimas (Tabela 16), verificou-se que o aumento da temperatura causou diminuição da estabilidade térmica das lipases. Neste sentido, quanto menor a constante de desnaturação maior foi o tempo de meia vida da enzima e conseqüentemente, mais estável foi na temperatura em análise. Assim, pôde-se inferir que em termos de tempo de meia vida, a lipase comercial foi menos estável, respectivamente, 10,5, 4,6 e 4,9% nas temperaturas de 40, 50 e 60°C, que a lipase do extrato enzimático. Porém, ambas apresentam maior estabilidade a 40°C. As lipases da *Burkholderia cepacia* do presente estudo, mostraram-se bem menos estáveis que a lipase *Burkholderia cepacia* LP08 dos estudos de Wang, Yu e Xu (2009), que reteram a 30°C, respectivamente, mais de 89 e 50% de sua atividade máxima por 36 e 84 h. Já a meia vida da lipase foi de 75, 72, 52 h a 25, 35 e 40° C. Estes valores indicam que a lipase de *Burkholderia cepacia* LP08 é mais termorresistente que as lipases da *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 e lipase comercial Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia* do presente trabalho.

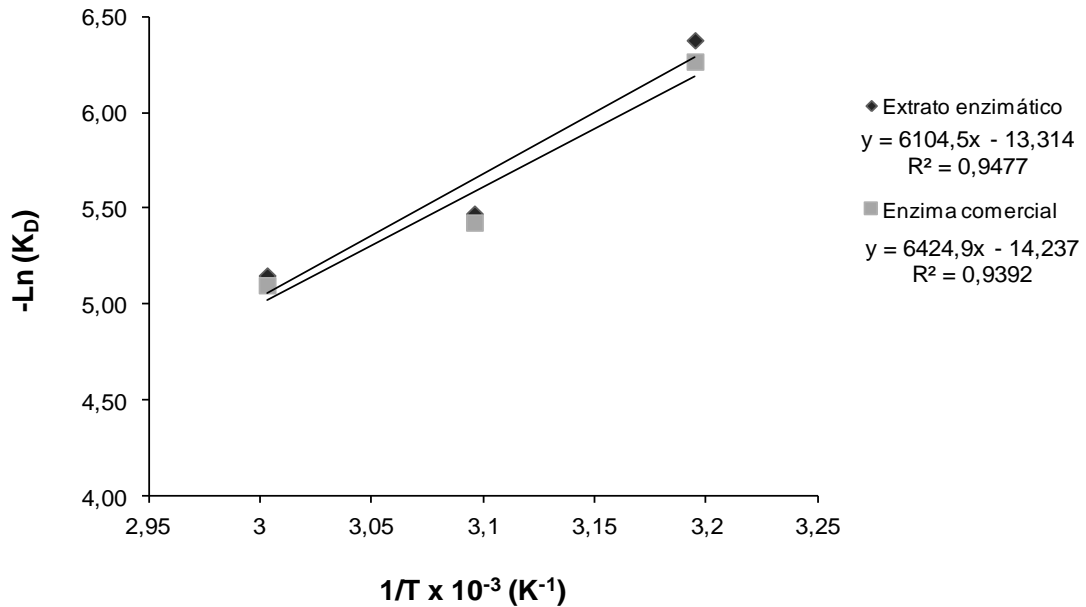
Acerca das estabilidades térmicas das lipases do extrato enzimático e comercial, notou-se também, que houve razoável diferença entre a temperatura de

40°C e as demais estudadas nesta pesquisa. Considerando que o tempo de meia vida é aquele necessário para reduzir a concentração da enzima a metade, nas temperaturas de 50 e 60°C, houve redução superior a 59% desse tempo, em relação à temperatura de 40°C. Evidenciando, que ambas as lipases são mais estáveis a temperaturas mais brandas e que apresentam o mesmo perfil de estabilidade térmica. De forma geral, os valores ótimos de estabilidade térmica da lipase de origem microbiana compreendem a faixa de 30 a 40°C (FREIRE, 1996), sendo assim, os valores obtidos para as estabilidades térmicas da lipase comercial e do extrato enzimático de *Burkholderia cepacia* estão em conformidade com a literatura.

Os resultados da constante de desnaturação e tempo de meia vida reportados por Castiglioni (2009) para a lipase de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 foram respectivamente de 0,0015, 0,0051 e 0,0052 min<sup>-1</sup> e 462,10, 135,91 e 133,30 min, para as temperaturas de 40, 50 e 60°C. Portanto, os valores encontrados no presente trabalho foram bastante semelhantes, apesar de esse autor ter utilizado o método titulométrico e neste utilizou-se o método espectrofotométrico. Para a lipase proveniente de *Pseudomonas sp.* cepa S5 o tempo de meia vida a 50°C foi de 1 h (RAHMAN et al., 2005), valor aproximadamente 60% menor que os obtidos no presente estudo. Contudo, na caracterização da *Pseudomonas mendocina* PK-12CS, Jinwal et al. (2003), obtiveram a 60°C, tempo de meia vida de apenas 10 min, indicando uma enzima extremamente sensível a temperatura, bem abaixo dos valores obtidos neste estudo.

As energias de ativação da hidrólise do p-nitrofenolpalmitato pelas lipases do extrato enzimático e comercial da *Burkholderia cepacia* foram obtidas pela regressão linear do logaritmo natural do coeficiente de desnaturação em função do inverso da temperatura, seguindo o método de Arrhenius, como pode ser observado na figura 16. As equações das retas ( $y = ax + b$ ) obtidas na figura 16 foram igualadas a equação de Arrhenius ( $\ln K_d = \ln K - E_{ad}/RT$ ) para obtenção das energias de ativação de desnaturação das reações em análise, bem como das equações de Arrhenius. O valor da constante de gases ideais (R) considerado foi de 8,31451 J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>. As energias de ativação obtidas foram respectivamente de 50,756 kJ.mol<sup>-1</sup> e 53,420 kJ.mol<sup>-1</sup> para a lipase do extrato enzimático e da enzima comercial da *Burkholderia cepacia*. Padilha (2010), caracterizando a *Burkholderia cepacia* obteve a energia de ativação de 10,1 kJ.mol<sup>-1</sup>, valor menor ao encontrado neste trabalho, contudo a faixa de temperatura analisada pelo autor foi de 25 a 37°C. Para

a lipase 5-DM de *Candida albicans*, Lan et al. (2011) obtiveram a energia de ativação de  $35,53 \text{ kJ.mol}^{-1}$  para a faixa de temperatura ente 5 e  $25^\circ\text{C}$ . Estes resultados refletem a baixa energia de ativação para que a desnaturação enzimática se inicie, indicando que as lipases não são termoresistentes.



**Figura 16.** Energia de ativação da desnaturação da lipase de extrato enzimático e da lipase comercial de *Burkholderia cepacia*.

As equações de Arrhenius obtidas para a lipase do extrato enzimático e da enzima comercial estão apresentadas nas equações 7 e 8, respectivamente. Por meio destas equações pôde-se comparar os valores teóricos das constantes de desnaturação e dos tempos de meia vida e os obtidos experimentalmente para as temperaturas de 40, 50 e  $60^\circ\text{C}$  (Tabela 17).

$$K_d = 6,056 \times 10^5 \exp^{(-61045/T)} \quad (\text{Eq. 7})$$

$$K_d = 1,524 \times 10^6 \exp^{(-64249/T)} \quad (\text{Eq. 8})$$

Verificou-se que os valores experimentais foram próximos aos teóricos, o que caracterizou boa linearização dos dados experimentais. Observa-se também, que com o aumento da temperatura a estabilidade das enzimas decresceu. A lipase do extrato enzimático apresentou maior estabilidade ao aumento da temperatura do que a lipase da enzima comercial, uma vez que as constantes de desnaturação do extrato enzimático foram menores em todas as temperaturas avaliadas, bem como



apresentaram maior tempo de meia vida. Isso pode ser explicado pelo fato do extrato enzimático conter junto à lipase compostos nitrogenados, ácidos orgânicos, sais, produtos intra e extracelulares, etc, ocasionando indiretamente a proteção da enzima, ao passo que, a lipase comercial foi muito mais sensível a condições adversas.

**Tabela 17.** Valores teóricos e experimentais das constantes de desnaturação ( $K_d$ ) e dos tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) da lipase de extrato enzimático e da lipase comercial de *Burkholderia cepacia* para as temperaturas de 40, 50 e 60°C.

T (°C)	Amostras	Teórico		Experimental	
		$K_d$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)	$K_d$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)
40	Extrato enzimático	0,0021	330,070	0,0017	407,734
	Enzima comercial	0,0019	364,814	0,0019	364,814
50	Extrato enzimático	0,0038	182,407	0,0042	165,035
	Enzima comercial	0,0035	198,042	0,0044	157,534
60	Extrato enzimático	0,0066	105,022	0,0058	119,508
	Enzima comercial	0,0064	108,304	0,0061	113,631

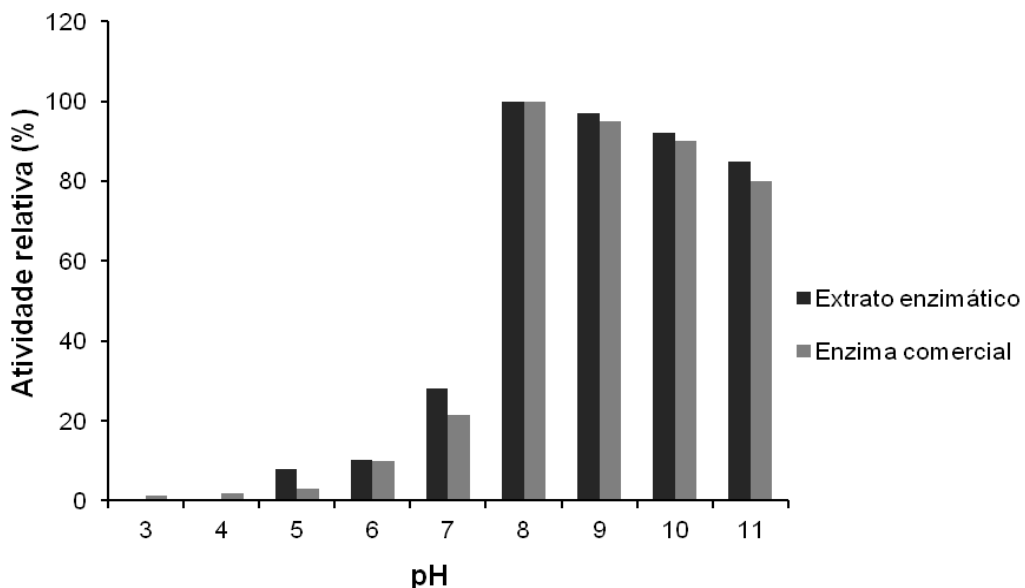
Nesse sentido, quando a enzima é estável a temperaturas elevadas, a produtividade da reação pode ser significativamente aumentada, operando a temperatura relativamente alta e em menor intervalo de tempo, fato que é interessante industrialmente para bioprocessos (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Entretanto, as lipases de *Burkholderia cepacia* do presente estudo não possuíram como característica a termoestabilidade em temperaturas maiores ou iguais a 50°C.

#### 5.4.3 Efeito do pH na atividade da lipase

O efeito do pH na atividade da lipase do extrato enzimático da *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 e da enzima comercial (Amano lipase PS-*Burkholderia cepacia*) foi estudado na faixa de pH de 3,0 a 11,0. A atividade enzimática das lipases da *Bulkholderia cepacia* foi maior em condições alcalinas, com máximo no pH 8,0 (100%), conforme pode ser observado na figura 17. De acordo com Lima et al. (2004), as lipases, geralmente, têm melhor atividade em pH neutro ou alcalino.

As atividades lipolíticas do extrato enzimático e da enzima comercial apresentaram comportamentos bastante semelhantes a partir do pH 6,0,

principalmente em pHs alcalinos (8,0 a 11,0). As duas enzimas mantiveram elevada atividade relativa em pH 9,0, de 97 e 95%, respectivamente e superior a 80% no pH 11,0. Em pH neutro, observou-se redução da atividade enzimática em mais de 70% e em pHs ácidos, as enzimas foram extremamente sensíveis, perdendo mais de 90% de atividade em pHs abaixo ou igual a 5,0. Nos pHs de 3,0 e 4,0, a lipase proveniente do extrato bruto, foi totalmente inativada. Em condições ótimas, a enzima não sofre alterações em sua estrutura tridimensional nativa. Contudo, em condições adversas e até mesmo extremas, há a diminuição das forças não covalentes (pontes de hidrogênio, forças iônicas, interações hidrofóbica, etc), exceto interações hidrofóbicas, que mantém a enzima estável, consequentemente, a mesma sofre alteração em sua estrutura, perdendo atividade e sendo totalmente inativada quando ocorre desdobramento da estrutura tridimensional (LEHNINGER, 1986).



**Figura 17.** Atividade relativa das lipases de extrato enzimático e comercial de *Burkholderia cepacia* em função do pH entre a faixa 3 e 11, a 37°C por 30 min.

Outro fator, que pode ter contribuído para os diferentes valores, se refere à limitação da técnica utilizada. Segundo Kademi, Aït-Abdelkader e Fakhreddine (2000), a atividade enzimática por espectrofotometria para valores de pH inferiores a 7,0, não possibilitam a absorção de p-nitrofenol, justificando em parte os resultados encontrados nos pH de 3,0 a 6,0. Por outro lado, as lipases também podem ser extremamente sensíveis a pHs ácidos. Observou-se ainda, que a taxa de hidrólise

do p-nitrofenolpalmitato foi muito alta para os pHs de 10 e 11. Sabe-se que a hidrólise do p-nitrofenolpalmitato é evidenciada pela coloração amarela, no entanto, em pHs alcalinos essa coloração é intensificada, e sem correlação direta com a atividade enzimática.

Padilha (2010), analisando a mesma faixa de pH e os mesmos tipos de tampões, utilizando método titulométrico, e como substrato óleo de oliva a 37°C, obteve atividade máxima também em pH 8,0, contudo os demais resultados do presente trabalho não foram semelhantes, dado aos diferentes métodos utilizados. Nos pHs de 5,0 a 7,0 a atividade da enzima manteve-se próxima a 80%, e com pequenas variações em pHs mais ácidos. Em pHs básicos de 9,0 a 11,0, houve redução da atividade superior a 60%. Castiglioni (2009), estudando a mesma bactéria e utilizando a mesma metodologia de determinação da atividade enzimática que Padilha (2010), também encontrou pH 8,0 como o ideal, com demais resultados bastante semelhantes para a faixa entre os pHs de 3,0 a 11,0.

Wang, Yu e Xu (2009) analisaram os pHs de 8,0 a 12,0 (tampão Tris-HCl para pH de 8,0 e 9,0, tampão ortofosfato hidrogênio disódico-NaOH para pH de 9,0 a 11,0 e tampão glicina-NaOH para pH até 12,0), utilizando o método espectrofotométrico e substrato p-nitrofenolpalmitato a 37°C, e obtiveram pH 11,0 como o ideal para a *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 em dois minutos de reação. Este resultado não está de acordo com o encontrado no presente trabalho. Contudo, a atividade enzimática não depende apenas do pH, mas também do tipo de tampão utilizado (SUPAKDAMRONGKUL; BHUMIRATANA; WIWAT, 2010), sendo assim, este pode ser um dos motivos para explicar as diferenças encontradas entre os trabalhos, mesmo se tratando da lipase proveniente do mesmo microrganismo, a *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. Outros trabalhos com diferentes cepas de *Burkholderia cepacia*, como a *B. cepacia* DSM 3401, *B. cepacia* KWI 56 e *B. cepacia* ST 200, apresentaram pH ideal de 9,0, 9,0 e 7,0, respectivamente (SVENDSEN et al., 1995; TRAUB et al., 2001; TAKEDA; AONO e DOUKYU, 2006), valores bastante próximos ao obtido no presente trabalho.

Wang et al. (2009), analisando a lipase de *Burkholderia cepacia* LP08 para produção de detergentes, analisaram a faixa de pH de 5,0 a 10,6 (tampão fosfato para pH de 5,0 a 9,0, tampão glicina-NaOH para pHs acima de 9,0), pelo método espectrofotométrico, substrato pNPP a 25°C e determinaram que houve atividade em toda a faixa de pH analisada. A atividade máxima observada foi em pH

9,0. A análise do pH ótimo para a *Pseudomonas sp.* S5, realizada por Rahman et al. (2005), por meio de método espectrofotométrico, substrato óleo de oliva e absorbância a 715 nm, obteve-se atividade máxima em pH 9,0 e redução drástica da atividade em pHs menores ou iguais a 6,0 e pH 10,0, havendo redução de 80 a 100% da atividade original. Para os pHs ácidos, o resultado para a *Pseudomonas sp.* S5 foi bastante semelhante aos obtidos nesta pesquisa. De acordo com a literatura, geralmente, a produção das lipases das cepas de *Burkholderia cepacia* é favorecida em meios alcalinos (LIMA et al., 2004). Os trabalhos citados dão uma ideia da variabilidade microbiológica em relação ao pH do substrato reacional.

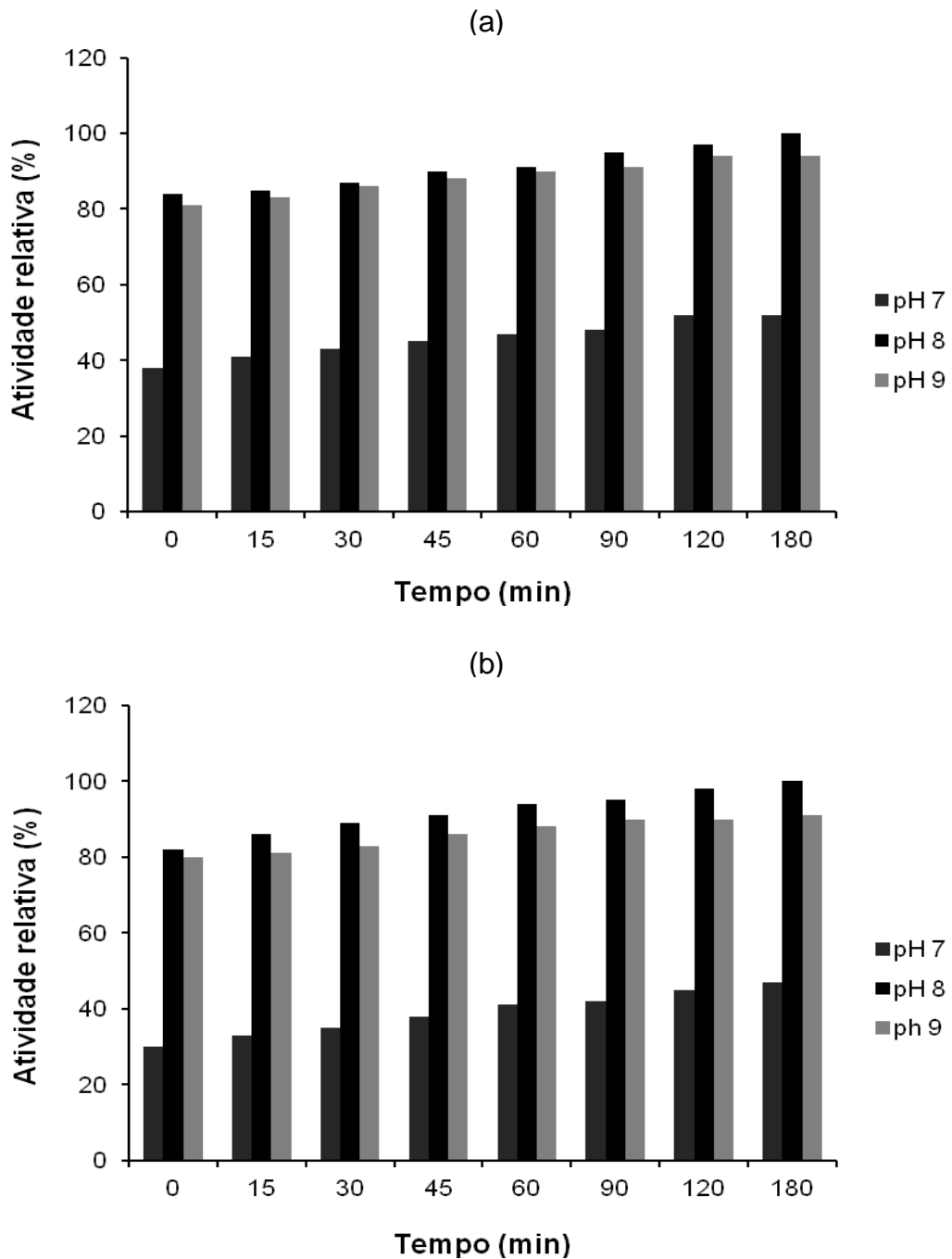
#### 5.4.4 Efeito do pH na estabilidade da lipase

O efeito dos pHs 7,0, 8,0 e 9,0, na estabilidade das lipases, também foram estudados, por 180 min de incubação a 37°C. A atividade máxima foi observada no pH 8,0, após 180 min de incubação, e os menores valores residuais foram de 48 e 53% no pH 7,0, para a lipase do extrato enzimático e comercial da *Burkholderia cepacia*, respectivamente. No pH 7,0, a atividade foi reduzida consideravelmente, entretanto, as enzimas se mantiveram estáveis durante todo tempo de incubação estudado. O comportamento da estabilidade das enzimas foi semelhante em todos os pHs analisados, conforme pode ser observado nos gráficos da atividade relativa (%) da lipase em função do tempo, para o extrato enzimático e lipase comercial de *Burkholderia cepacia* (Figura 18) (Apêndice G).

As lipases proveniente do extrato enzimático e do produto comercial mostraram boa estabilidade nos pHs alcalinos, mantendo mais de 80% de atividade ao longo do tempo analisado, apresentando incremento de 16 e 18% na atividade final, respectivamente. Castiglioni (2009) e Padilha (2010) também avaliaram a estabilidade da lipase da *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 por 240 min a 37°C, de forma semelhante, obtiveram atividade máxima em pH 8.

Wang et al. (2009) analisaram a estabilidade da lipase da *Burkholderia cepacia* LP08 por 84 h a 25°C nos pHs 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0, utilizando método espectrofotométrico e substrato p-nitrofenolpalmitato. A atividade máxima foi obtida no tempo zero, havendo decréscimo da atividade para todos os pHs no decorrer do período de incubação. Contudo, os menores decréscimos ocorreram nos pHs 8 e 9. A lipase reduziu 74, 55 e 42% da atividade máxima em pH 7,0, 9,0 e 8,0,

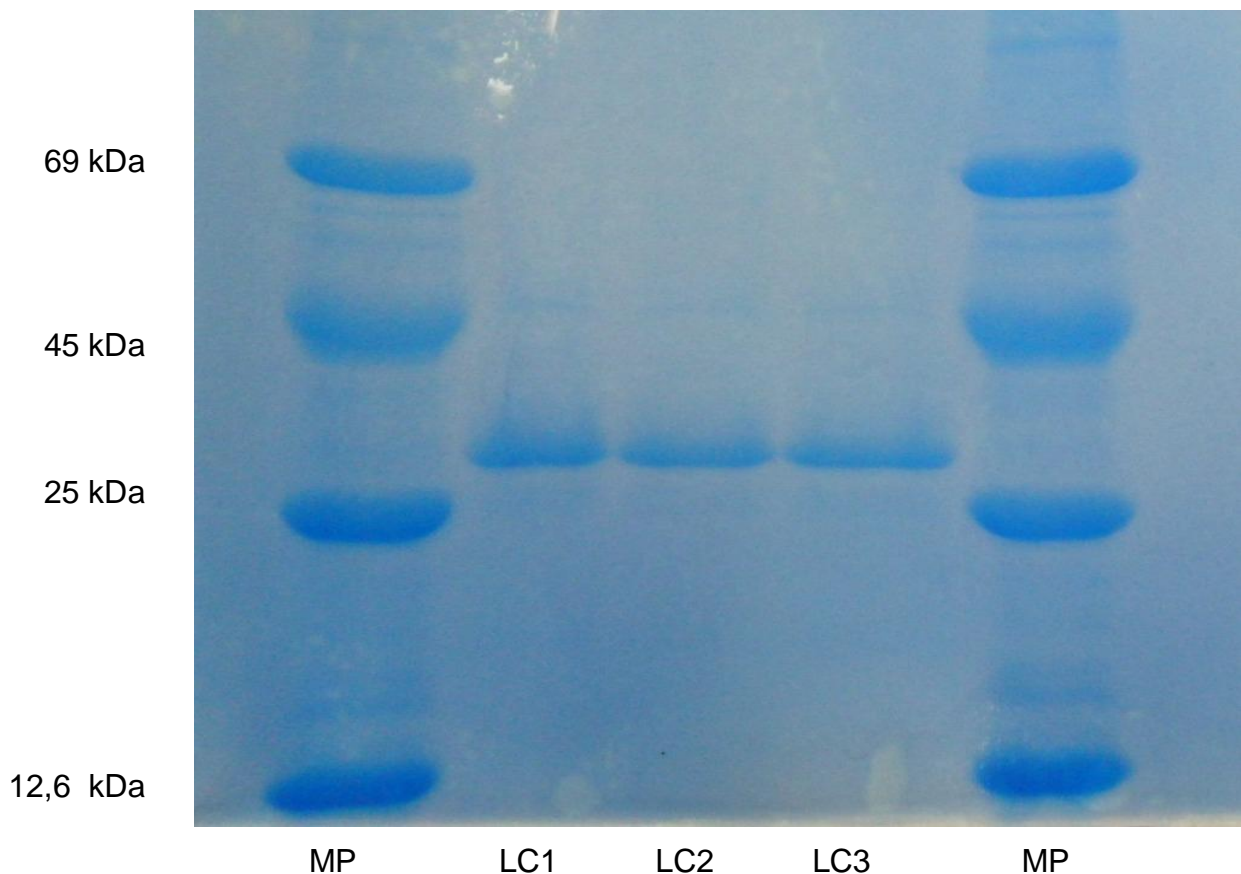
respectivamente, após as 84 h. Apesar dos diferentes resultados, foi possível inferir que as lipases provenientes das cepas de *Burkholderia cepacia* são enzimas estáveis em pHs levemente alcalinos. A dificuldade de comparação dos resultados foi proveniente da falta de padronização das metodologias para a caracterização enzimática.



**Figura 18.** Efeito do pH na estabilidade da lipase do extrato enzimático da *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 (a) e da lipase comercial Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia* (b), na faixa de pH entre 7 e 9 a 37°C por 3 h.

#### 5.4.5 Determinação da massa molecular da lipase comercial Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia* por eletroforese SDS-PAGE

A lipase comercial foi analisada por eletroforese SDS-PAGE em condições desnaturantes e apresentou uma banda de proteína com massa molecular de aproximadamente 33 kDa, conforme a figura 19. Semelhantemente, Castiglioni (2009) e Padilha (2010) obtiveram 33 kDa para a lipase de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. O resultado obtido nesta pesquisa foi 15,4% menor ao encontrado por Wang et al. (2009), que obtiveram massa molecular de 39 kDa para a *Burkholderia cepacia* LP08.



**Figura 19.** Eletroforese em gel poliacrilamida (SDS-PAGE 15%), corada por *Coomassie*, de amostras de lipase comercial Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia* (LC 1, 2 e 3) e marcador padrão (MP).

Geralmente, as cepas de *Burkholderia cepacia* apresentam massa molecular na faixa de 30 a 40 kDa. Valor de massa molecular 5,7% menor que o obtido no presente trabalho para a cepa de *Burkholderia cepacia*, foi encontrado

para a lipase de *Bacillus licheniformis*, que apresentou massa molecular de 35 kDa (ANNAMALAI et al., 2011). Entretanto, Ji et al. (2010) obtiveram valor superior para a lipase de *Pseudomonas aeruginosa* LX1, de 56 kDa. As massas moleculares de lipases de diferentes fontes encontram-se, comumente, na faixa de 19 a 65 kDa, podendo variar de 8 a 180 kDa (OH et al., 1999; BANDMANN et al., 2000). Foi possível verificar também, que a lipase comercial utilizada neste trabalho possuía elevada pureza, haja vista que nas colunas das amostras da lipase não foi observada formação de outras bandas junto à amostra da lipase, indicando a presença de uma única proteína, nesse caso, referente à lipase comercial Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia*.

## 5.6 APLICAÇÃO DA LIPASE EM EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE BATATAS FRITAS

### 5.6.1 Caracterização do efluente

A caracterização dos efluentes utilizados nos estudos de hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente da indústria Micos Cicopal Ltda. está apresentada na tabela 18.

**Tabela 18.** Demanda química de oxigênio (DQO), óleos e graxas, acidez, potencial hidrogeniônico (pH) e alcalinidade total dos efluentes coletados na estação de tratamento e efluente da Micos Cicopal Ltda., em dois momentos diferentes.

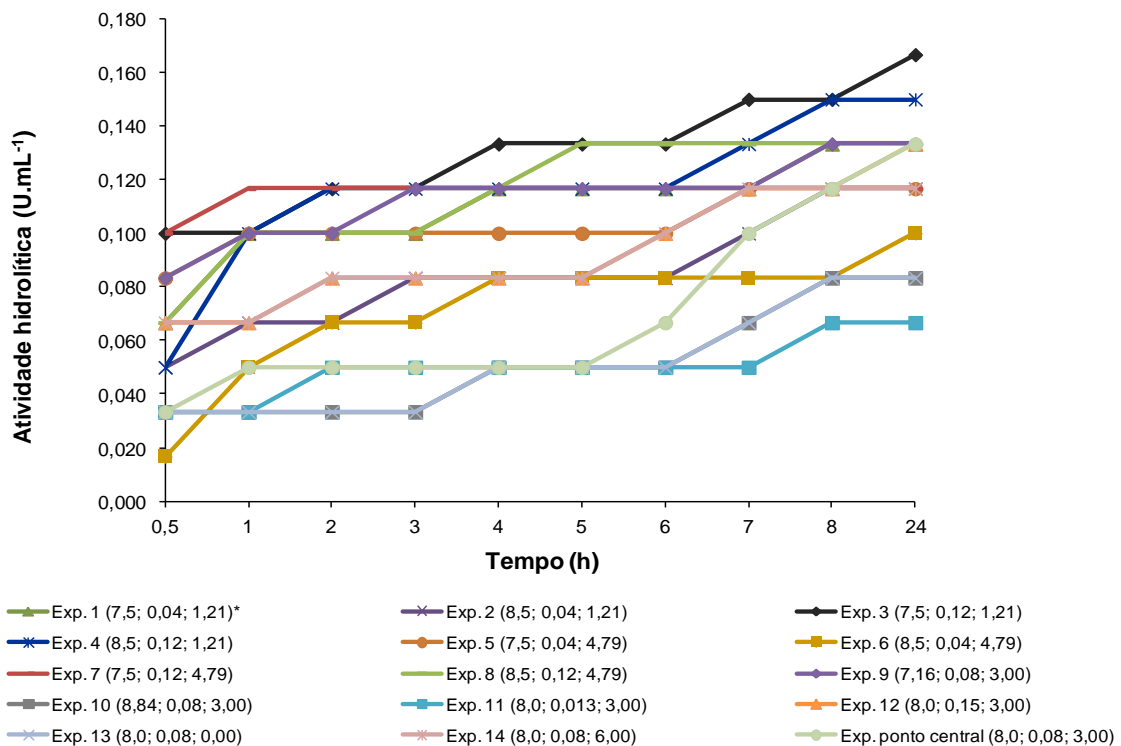
Parâmetro	Valor	
	1ª coleta	2ª coleta
DQO (mg.L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub> )	8.119,0	43.030,0
Óleos e graxas (mg.L <sup>-1</sup> )	1.304,6	34.399,0
Acidez (mg.L <sup>-1</sup> )	111,0	500,0
pH	5,29	5,33
Alcalinidade total (mg.L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> )	102,0	440,0

Nas duas caracterizações do efluente, a concentração de óleos e graxas apresentou valor consideravelmente alto. As principais fontes de geração de lipídeos são indústrias de óleos comestíveis, sorvetes, laticínios, curtumes, matadouros, efluentes domésticos, de restaurantes e de *fast food* (MENDES et al., 2005).

## 5.6.2 Estudo da hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente da indústria Micos Cicopal Ltda. pela lipase comercial de *Burkholderia cepacia*

### 5.6.2.1 Avaliação da influência do pH, da concentração de enzima e do agente emulsificante na hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente industrial pela lipase comercial Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia*

Para analisar o efeito da atuação do pH, da concentração de lipase e do agente emulsificante sobre o efluente avaliou-se a evolução da hidrólise em função do tempo. A figura 20 apresenta a evolução da atividade hidrolítica durante as 24 h de degradação do efluente pela lipase comercial (Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia*).



\*Na qual: Exp n: número do experimento (pH; concentração de enzima [g.mL<sup>-1</sup>]; volume de goma arábica a 7% [mL]), no qual X equivale ao número do experimento.

**Figura 20.** Evolução da hidrólise do efluente da indústria Micos Cicopal Ltda. pela lipase comercial Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia* durante 24 h de reação.

As atividades hidrolíticas mínima e máxima foram de 0,0667 (experimento 11) e 0,1667 U.mL<sup>-1</sup> (experimento 3), respectivamente para 24 h de reação. Como esperado, a atividade hidrolítica aumentou durante as 24 h de reação. Contudo,



variou para a maioria dos experimentos nos primeiros 30 min de hidrólise, posteriormente, um incremento na atividade de hidrólise levou de 2 a 3 h para ser detectado quantitativamente em vários experimentos. Somente as variáveis pH e concentração de enzima foram significativas para o tempo de 30 min. Portanto, foram considerados os resultados para a atividade hidrolítica sobre o efluente coletado em função do pH, da concentração de enzima e do volume de goma arábica a 7% no tempo de 30 min de reação (Tabela 19).

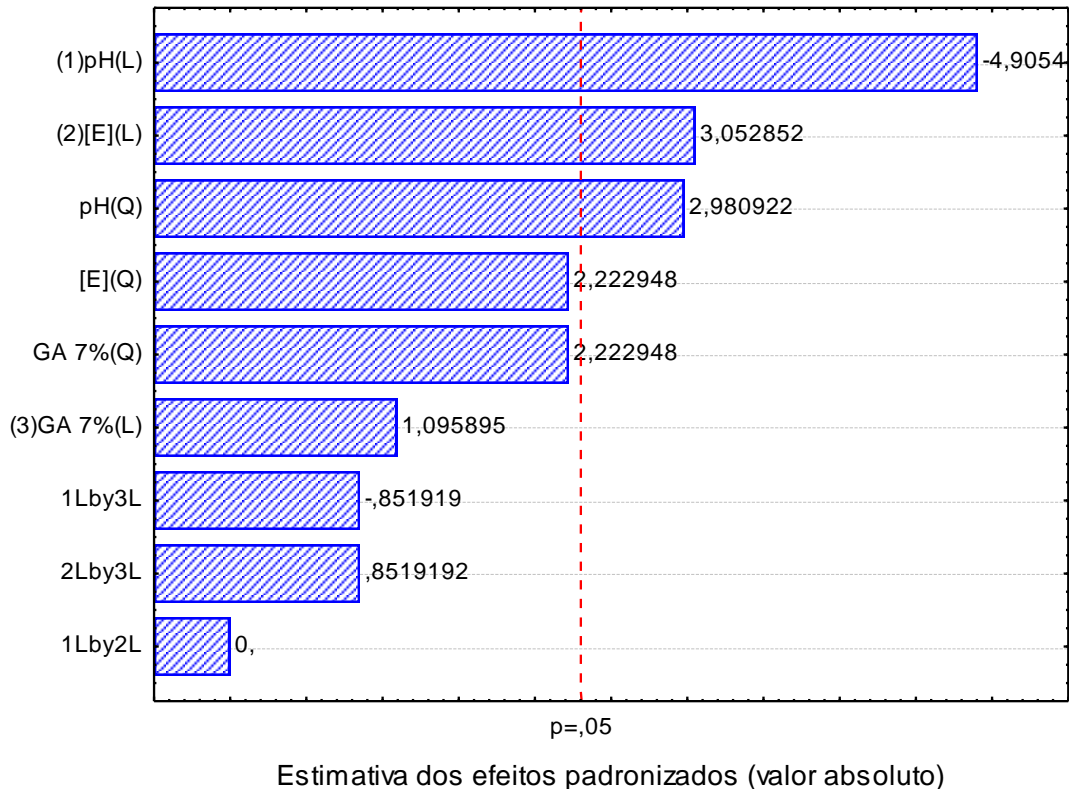
**Tabela 19.** Matriz codificada e resposta da atividade hidrolítica sobre o efluente da Micos Cicopal Ltda. em função do potencial hidrogeniônico (pH), da concentração de enzima ([E]) e do volume de goma arábica a 7% (GA 7%) durante 30 min de hidrólise.

Ensaio	pH	[E]	GA 7%	Atividade hidrolítica (U.mL <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	-1	0,0667
2	1	-1	-1	0,0500
3	-1	1	-1	0,1000
4	1	1	-1	0,0500
5	-1	-1	1	0,0833
6	1	-1	1	0,0167
7	-1	1	1	0,1000
8	1	1	1	0,0667
9	-1,68	0	0	0,0833
10	1,68	0	0	0,0333
11	0	-1,68	0	0,0333
12	0	1,68	0	0,0667
13	0	0	-1,68	0,0333
14	0	0	1,68	0,0667
15	0	0	0	0,0333
16	0	0	0	0,0333
17	0	0	0	0,0333
18	0	0	0	0,0333

O efeito linear e quadrático do pH ( $p=0,0012$  e  $p=0,0176$ , respectivamente) e o efeito linear da concentração de enzima ( $p=0,0158$ ) foram significativos ao nível de 95% de confiança. Os demais efeitos não foram significativos (Apêndice H). Estes efeitos podem ser visualizados pelo diagrama de Pareto (Figura 21).

O pH (L e Q) foi a variável que mais produziu efeito nas respostas de hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente, seguida da concentração de enzima (L). A influência quadrática do pH indicou que houve uma diminuição na hidrólise do

efluente até atingir um ponto de mínimo e depois a hidrólise aumentou, ou seja, há um pH na qual a hidrólise do efluente foi mínima.



**Figura 21.** Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados do potencial hidrogeniônico (pH), da concentração de enzima ([E]) e do volume de goma arábica a 7% (GA 7%) durante 30 min de hidrólise, sobre a resposta atividade hidrolítica do efluente da Micos Cicopal Ltda.

A partir da estimativa do efeito de cada variável foi gerado um modelo matemático completo significativo ( $p=0,0116$ ), com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,8913, coeficiente de variação de 23,70% e falta de ajuste significativa ( $FA=0,0000$ ). Porém, devido o quadrado médio do erro experimental ser baixo ( $QM=8,5978 \cdot 10^{-19}$ ), a falta de ajuste foi considerada aparente e o modelo foi ajustado (WASZCZYNSKYJ et al., 1981). Entretanto, o modelo não pode ser usado para fins preditivos, pois o coeficiente de variação foi muito alto, servindo apenas para verificar a tendência da resposta. O modelo matemático ajustado apresentou coeficiente de determinação de 0,8356 e coeficiente de determinação ajustado de 0,7460. Os coeficientes da regressão de cada termo obtido na análise de regressão após o ajuste do modelo estão apresentados no apêndice I.

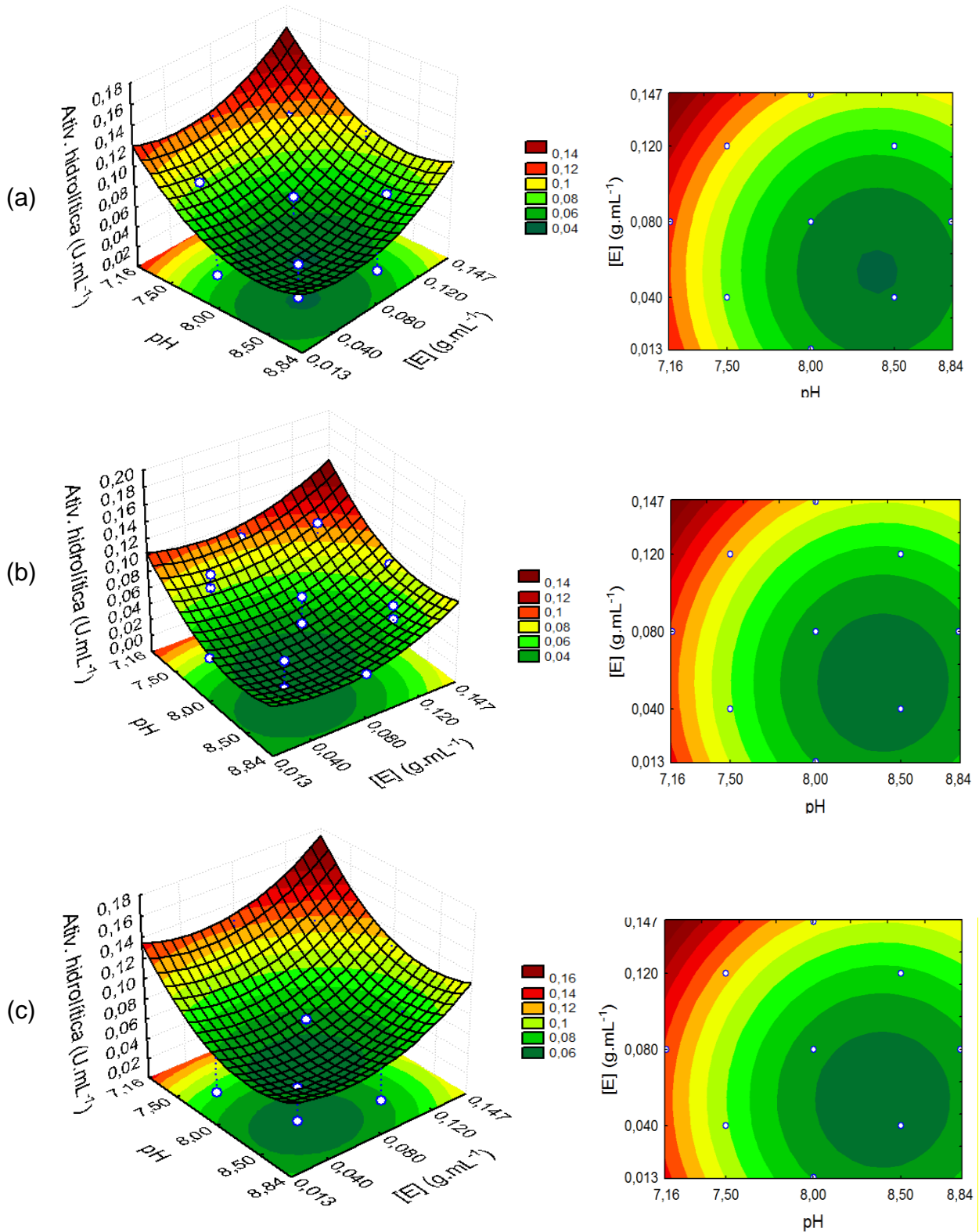
A equação 9 representa o modelo matemático ajustado, representando a atividade hidrolítica de degração do efluente (AH) em função do pH ( $X_1$ ), da concentração de enzima ( $X_2$ ) e de goma arábica 7% ( $X_3$ ), utilizadas no processo de hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente industrial pela lipase comercial BC-ALPS. O termo linear do volume de goma arábica a 7%, apesar de não ser significativo, foi mantido na equação para melhoria do ajuste do modelo. Os termos destacados em negrito referem-se as variáveis estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

$$AH = 0,0327 - 0,0367X_1 + 0,0232X_1^2 + 0,0229X_2 + 0,0173X_2^2 + 0,0082X_3 + 0,0173X_3^2$$

(Eq. 9)

A partir do modelo ajustado foram construídos gráficos de superfície de resposta e de curvas de contorno para as variáveis em análise, com intuito de visualizar as melhores condições de degradação do efluente (Figura 22). Os níveis do volume de goma arábica a 7% foram fixados nos gráficos em 0, 3 e 6 mL. Não foi encontrado no primeiro ensaio uma área ótima de hidrólise do efluente, contudo obtiveram-se indicativos de melhores intervalos para as variáveis independentes, ou seja, deslocando-se os valores estudados em direção à maior concentração de enzima e menor pH, provavelmente, maior seria a hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente. As áreas dos gráficos com os maiores valores de atividade hidrolítica dos triacilglicerídeos ( $> 0,100 \text{ U.mL}^{-1}$ ) foram observadas na faixa de pH entre 7,16 e 7,5 (valores mais baixos neste estudo) ou em pHs entre 7,5 e 8,0 quando a concentração de enzima foi maior que  $0,12 \text{ g.mL}^{-1}$ , independente do volume de goma arábica utilizado, indicando que a maior concentração de enzima remeteu a maior atividade enzimática.

Quando não se utilizou a goma arábica, a área de mínimo foi verificada para a concentração de enzima de 0,041 a  $0,063 \text{ g.mL}^{-1}$  e para o pH de 8,27 a 8,52 (figura 22a). Quando o volume de goma arábica a 7% foi fixado em 3 mL (Figura 22b), a área de mínimo situou-se entre a concentração de enzima de 0,028 a  $0,079 \text{ g.mL}^{-1}$  e pH de 8,12 a 8,76; e quando o volume foi de 6 mL este intervalo foi observado entre 0,003 a  $0,088 \text{ g.mL}^{-1}$  de enzima e 8,03 a 8,78 de pH (Figura 22c). Observou-se que em pHs alcalinos seria necessária uma quantidade muito maior de enzimas para obtenção de bons resultados de reação de hidrólise.

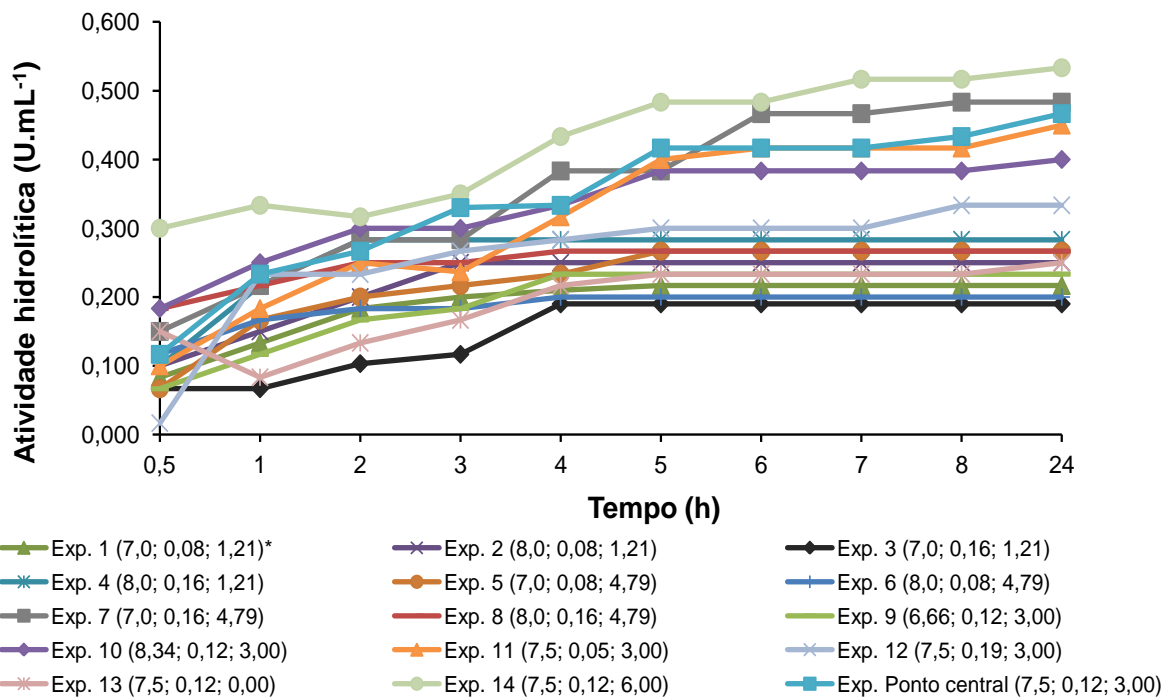


**Figura 22.** Superfície de resposta e curvas de contorno para a atividade hidrolítica em função do potencial hidrogeniônico (pH) e da concentração de enzima, fixando-se o volume de goma arábica a 7% nos níveis reais 0 (a), 3 (b) e 6 mL (c).

Como os valores das variáveis independentes não foram suficientes para otimização do processo de hidrólise do efluente realizou-se outro delineamento

experimental. O valor do ponto central para o pH foi deslocado para 7,5 e a concentração de enzima para  $0,120 \text{ g.mL}^{-1}$ , enquanto que o volume de goma arábica a 7% foi mantido o mesmo valor, de 3 mL no ponto central. O efluente caracterizado da segunda coleta foi utilizado para realização deste segundo ensaio. Como a concentração de óleos e gorduras (Tabela 18) foi superior ao do efluente da primeira coleta (utilizado no primeiro ensaio), então, para padronização do mesmo teor de óleos e gorduras do primeiro ensaio foi realizada a diluição do efluente da segunda coleta, ajustando-o para o mesmo teor de óleos e gorduras, ou seja,  $1.304,6 \text{ mg.L}^{-1}$ .

O segundo ensaio sobre o efeito da atuação do pH, da concentração de lipase e do agente emulsificante sobre o efluente, foi avaliado novamente pela evolução da hidrólise em função do tempo. A figura 23 apresenta a evolução da atividade hidrolítica durante as 24 h de degradação do efluente pela lipase comercial (Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia*).



\*Na qual: Exp. n: número do experimento (pH; concentração de enzima [g.mL<sup>-1</sup>]; volume de goma arábica a 7% [mL]).

**Figura 23.** Evolução da otimização da hidrólise do efluente da indústria Micos Cicopal Ltda. pela lipase comercial Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia* durante 24 h de reação.

As atividades hidrolíticas mínima e máxima foram de 0,1900 e 0,4833 U.mL<sup>-1</sup>, respectivamente para o tempo de 24 h, resultados bem acima dos obtidos no

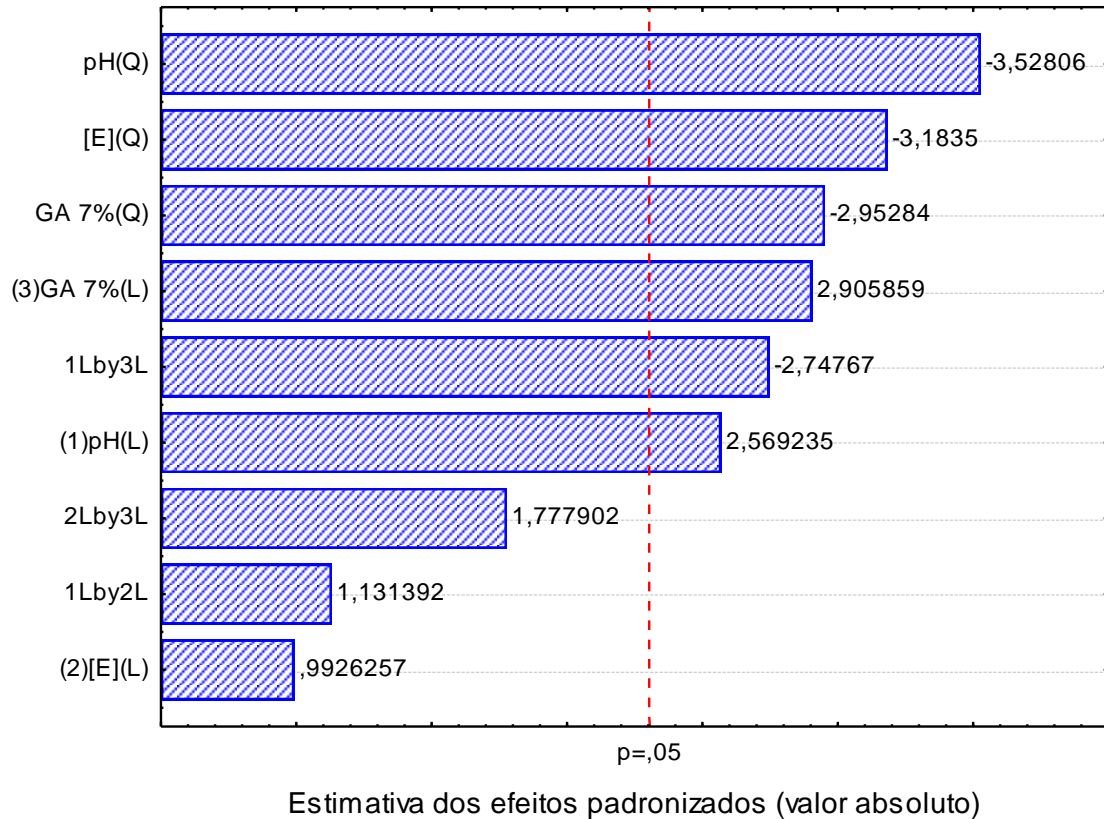
primeiro ensaio. O valor mínimo e máximo do primeiro ensaio correspondeu a 35,1 e 34,5% dos obtidos no segundo. A atividade hidrolítica da lipase comercial aumentou durante as 24 h de reação para os ensaios 2, 7, 10, 11, 14 e ponto central, para os demais ensaios a partir de 4 h de reação o valor da atividade hidrolítica permaneceu praticamente constante, portanto, infere-se que houve hidrólise total dos triacilglicerídeos do efluente. A maior variação entre os ensaios foi observada após 3 h de hidrólise, indicando que a produção de ácidos graxos livres tendeu a estabilização após esse período. Os resultados para a atividade hidrolítica sobre o efluente da indústria Micos Cicopal Ltda. em função do pH, da concentração de enzima e do volume de goma arábica a 7%, durante 3 h de reação estão apresentados na tabela 20.

**Tabela 20.** Atividade hidrolítica sobre o efluente da Micos Cicopal Ltda. em função do potencial hidrogeniônico (pH), da concentração de enzima ([E]) e do volume de goma arábica a 7% (GA 7%), após 3 h de hidrólise.

Ensaio	pH	[E]	GA 7%	Atividade hidrolítica (U.mL <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	-1	0,2000
2	1	-1	-1	0,2500
3	-1	1	-1	0,1167
4	1	1	-1	0,2833
5	-1	-1	1	0,2167
6	1	-1	1	0,1833
7	-1	1	1	0,2833
8	1	1	1	0,2500
9	-1,68	0	0	0,1833
10	1,68	0	0	0,3000
11	0	-1,68	0	0,2367
12	0	1,68	0	0,2663
13	0	0	-1,68	0,1667
14	0	0	1,68	0,3500
15	0	0	0	0,3333
16	0	0	0	0,3333
17	0	0	0	0,3333
18	0	0	0	0,3333

Os efeitos linear e quadrático do pH ( $p=0,0332$  e  $p=0,0078$ , respectivamente), quadrático da concentração de enzima ( $p=0,0129$ ), linear e quadrático do volume de goma arábica 7% ( $p=0,0197$  e  $p=0,0184$ , respectivamente) e a interação do pH com goma arábica a 7% ( $p=0,0252$ ) foram significativos,

enquanto os demais efeitos não foram significativos (Apêndice L). Os efeitos acima relatados podem ser visualizados no diagrama de Pareto (Figura 24).



**Figura 24.** Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados do potencial hidrogeniônico (pH), da concentração de enzima ([E]) e do volume de goma arábica a 7% (GA 7%) durante 3 h de hidrólise, sobre a resposta atividade hidrolítica do efluente da Micos Cicopal Ltda.

O pH (Q) foi a variável que mais produziu efeito nas respostas de hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente, seguida da concentração de enzima (Q) e volume de goma arábica a 7% (Q). As influências foram negativas, indicando que o aumento do pH, da concentração de enzima e do volume de goma arábica a 7% a partir de um ponto de máximo diminui a hidrólise dos efluente pela lipase comercial de *Burkholderia cepacia*. A influência quadrática desses parâmetros indica que existe um aumento na hidrólise do efluente até atingir um ponto de máximo e depois essa hidrólise diminui, ou seja, há um pH, concentração de enzima e volume de goma na qual a hidrólise do efluente é máxima ou ótima para determinadas condições de ensaio.

A partir da estimativa do efeito de cada variável foi gerado um modelo matemático completo significativo ( $p=0,0277$ ), com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,8565, coeficiente de variação de 14,89% e falta de ajuste significativa ( $FA=0,0000$ ). Porém, devido o quadrado médio do erro experimental ser baixo ( $QM=1,1769 \cdot 10^{-17}$ ), a falta de ajuste foi considerada aparente e o modelo foi ajustado (WASZCZYNSKYJ et al., 1981), o que significa que o modelo pode ser utilizado para fins preditivos.

A remoção do termo linear da concentração de enzima ( $p=0,3500$ ) e dos termos de interação pH com concentração de enzima ( $p=0,2907$ ) e de interação pH com goma arábica a 7% ( $p=0,1133$ ) conferiu coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{aj}$ ) menor que o do modelo completo, assim, o mesmos foram considerados relevantes e então, manteve-se o modelo completo com coeficiente de determinação ajustado de 0,7079. Os coeficientes de regressão de cada termo do modelo completo foram apresentados no apêndice I.

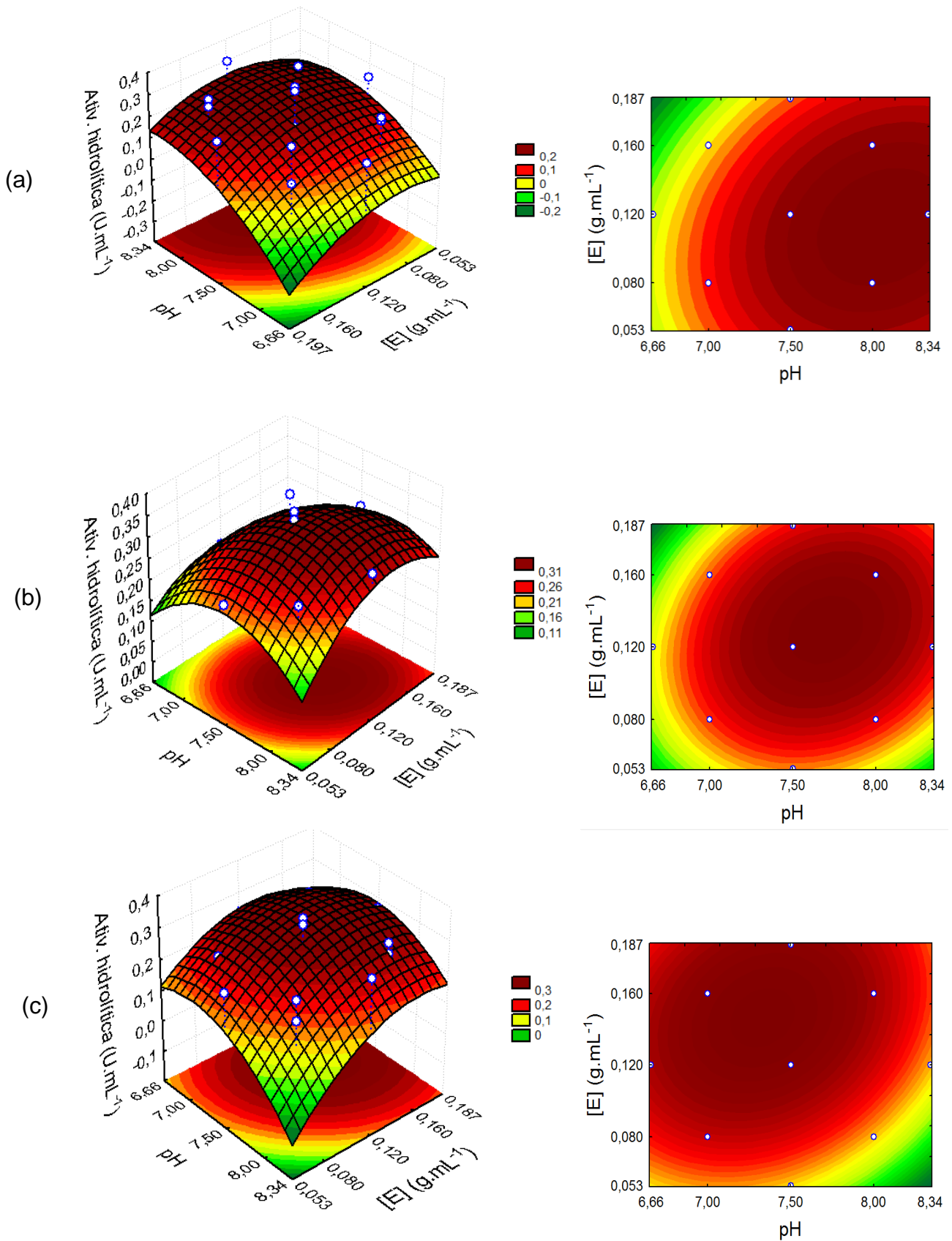
A equação 10 representa o modelo matemático completo, representando a atividade hidrolítica de degradação do efluente (AH) em função do pH ( $X_1$ ), da concentração de enzima ( $X_2$ ), do volume de goma arábica 7% ( $X_3$ ) e interações pH/[E] ( $X_4$ ), pH/GA 7% ( $X_5$ ) e [E]/GA 7% ( $X_6$ ). Os termos destacados em negrito referem-se as variáveis estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

$$AH = \mathbf{0,331} + \mathbf{0,025X_1} - 0,036X_1^2 + \mathbf{0,010X_2} - \mathbf{0,033X_2^2} + \mathbf{0,029X_3} - \mathbf{0,030X_3^2} + \\ + 0,015X_4 - \mathbf{0,035X_5} + 0,023X_6$$

(Eq. 10)

A superfície de resposta e de curvas de contorno do delineamento de otimização de degradação dos triacilglicerídeos do efluente estão apresentadas na figura 25. A atividade hidrolítica máxima ( $0,310 \text{ U.mL}^{-1}$ ) foi observada quando o volume de goma arábica a 7% foi fixado em 3 mL (Figura 23), entre o pH de 7,47 a 7,92 e concentração de enzima de 0,111 a 0,148. Quando o volume de goma arábica foi fixado em 0 e 6 mL, respectivamente, os intervalos foram de 8,47 a 7,58 e 7,66 a 7,0 para o pH e de 0,147 a 0,077 e 0,179 a 0,119 para a concentração de enzima, respectivamente.





**Figura 25.** Superfície de resposta e curvas de contorno do delineamento de otimização da atividade hidrolítica em função do potencial hidrogeniônico (pH) e da concentração de enzima, fixando-se o volume de goma arábica a 7% nos níveis reais 0 (a), 3 (b) e 6 mL (c).

Em trabalhos utilizando enzimas, quanto menor a concentração de lipase utilizada e maior a resposta obtida para a atividade hidrolítica, menor será o custo da operação em análise. No presente trabalho, a melhor resposta atividade hidrolítica foi obtida na área do gráfico com concentração de enzima de 0,111 a 0,148 g.mL<sup>-1</sup>. É mais vantajoso a utilização de menor quantidade de enzima, dentro desse intervalo ótimo, sem que ocorra redução da atividade hidrolítica, além de reduzir os custos do tratamento do efluente da indústria Micos Cicopal Ltda. Na literatura, resultados diferentes foram obtidos para a atividade hidrolítica em função da concentração de enzima. Valente et al. (2010), estudaram a pré-hidrólise da gordura de efluente da indústria de pescado pela lipase pura do fungo *Penicillium simplicissimum* nas concentrações de 0,2, 0,5 e 1,0% m/v em processo descontínuo. A diferença na produção de ácidos graxos livres produzidos nos experimentos não foi significativa, apesar de ter aumentado com o teor de *Penicillium simplicissimum* na hidrólise, devido possivelmente, ao fato de haver produção e consumo simultâneos desses compostos no meio reacional (LEAL; FREIRE e SANT'ANNA JR., 2002). No presente trabalho, a concentração de enzima foi significativa no processo de hidrólise no tratamento do efluente da Micos Cicopal.

Agentes emulsificantes, como a goma arábica, têm sido sistematicamente empregados em dosagens de atividade lipolítica quando se utilizam triacilglicerídeos de cadeia longa como substratos, não sendo considerados interferentes na hidrólise enzimática de lipídeos (MENDES; CASTRO, 2004). Pereira, Castro e Furigo (2003), estudando a hidrólise de lipídeos de efluentes gerados em frigoríficos avícolas, pela lipase de *Candida rugosa*, verificaram que a hidrólise máxima foi obtida quando se utilizou 3% de agente emulsificante no meio reacional. Contudo, Tiss et al. (2002) observaram o efeito de inibição da goma arábica sobre a hidrólise de ésteres trioctanóicos, com a utilização de lipases de fontes microbiana e animal, e sugeriram que essa inibição foi decorrente de compostos tensoativos presentes nas formulações de goma arábica e da própria goma, por meio de efeito de dessorção da lipase na interface óleo/água. No presente trabalho, o uso da goma arábica a 7% como agente emulsificante não inibiu a reação de hidrólise, uma vez que se obteve melhor resposta da atividade hidrolítica quando a goma arábica foi utilizada no meio reacional.

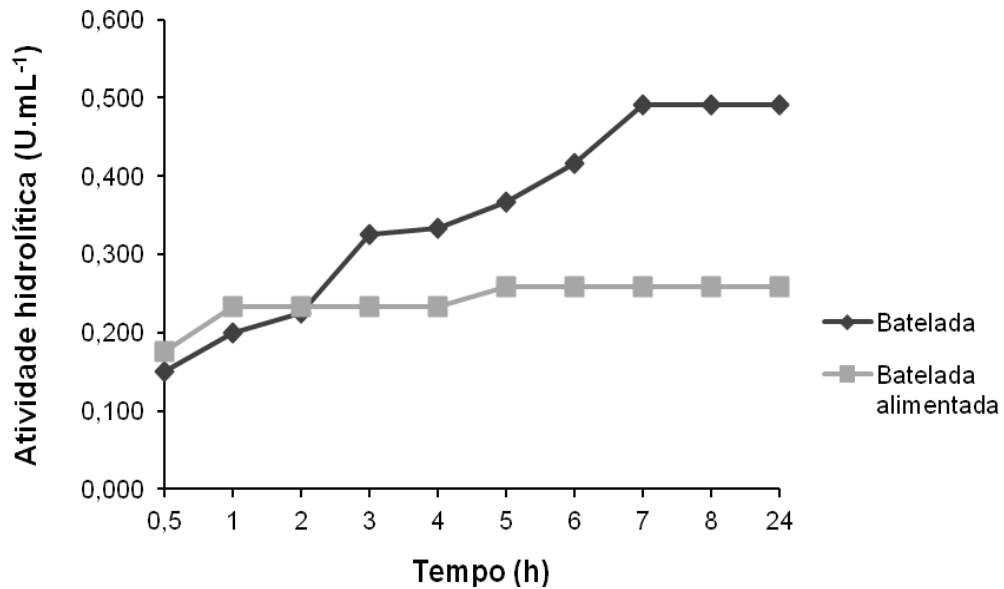
O desempenho insatisfatório na atividade enzimática observado em pHs maiores que 8,34 pode ser atribuído a rápida elevação do pH do meio reacional a

valores maiores que 9,0, afastando-se assim, do pH ótimo de atuação da lipase comercial de *Burkholderia cepacia*, resultando na redução da atividade hidrolítica da enzima. Em pHs menores que 6,66, possivelmente, houve também inibição da lipase, haja vista que estas atuam, preferencialmente, em pHs alcalinos ou próximos do neutro. Essas alterações podem estar relacionadas com possíveis mudanças conformacionais da enzima ou alterações no macroambiente, ou seja, na concentração do substrato, produto, íons hidrogênio e íons hidroxilas do meio reacional (SAID; PIETRO, 2004; FERNANDES, 2007). Nos estudos de Pereira, Castro e Furigo (2003) as porcentagens de hidrólise mais elevadas de efluentes de indústrias avícolas foram obtidas em pH 7, resultado que está de acordo com o obtido no presente trabalho.

A validação do modelo proposto foi realizada em triplicata. Foi estabelecido  $X_1$  de 7,5 de pH,  $X_2$  de 0,12 g.mL<sup>-1</sup> de enzima comercial de *Burkholderia cepacia*,  $X_3$  de 3 mL de volume de goma arábica a 7% e  $AH_{est}$  (resposta estimada pelo modelo para atividade hidrolítica) de 0,310 U.mL<sup>-1</sup>. A resposta obtida experimentalmente (AH) foi de 0,330 U.mL<sup>-1</sup>. O erro em relação ao modelo foi de 6,06%, indicando que os resultados experimentais foram adequadamente ajustados ao modelo proposto.

#### 5.6.2.2 Avaliação da influência dos processos descontínuo e descontínuo alimentado na hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente industrial pela lipase comercial Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia*

Após obter a otimização da reação de hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente analisou-se também o efeito do modo de operação do processo, descontínuo e descontínuo alimentado sobre a reação. A utilização do processo descontínuo permitiu a obtenção de resultados bastante satisfatórios para a hidrólise do efluente. Observou-se pela figura 26 que houve aumento da atividade hidrolítica constantemente durante as sete primeiras horas de reação, sendo a máxima atividade hidrolítica encontrada de 0,492 U.mL<sup>-1</sup>. Entretanto, no processo descontínuo alimentado a reação de hidrólise foi vigorosa apenas na primeira hora, com atividade de 0,233 U.mL<sup>-1</sup>. A partir de então, a variação na atividade hidrolítica ocorreu apenas depois de 4 h de reação (0,258 U.mL<sup>-1</sup>), permanecendo estável até o final da processo, no tempo de 24 h.



**Figura 26.** Evolução da hidrólise do efluente da indústria Micos Cicopal Ltda. pela lipase comercial Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia* durante 24 h de reação, em processo descontínuo e descontínuo alimentado, com pH 7,5; concentração de enzima de  $0,12 \text{ g.mL}^{-1}$  e volume de goma arábica a 7% de 3 mL.

O modo de operação do processo, descontínuo e descontínuo alimentado, influenciou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) a reação hidrolítica dos triacilglicerídeos do efluente pela lipase comercial Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia* (Tabela 21). Apenas no tempo 2 h de reação que as atividades hidrolíticas dos triacilglicerídeos, pela lipase comercial de *Burkholderia cepacia*, não foram consideradas estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

Como na primeira hora de reação do experimento, a relação enzima/efluente foi maior para o processo descontínuo alimentado, o mesmo apresentou maior hidrólise dos triacilglicerídeos do que o processo descontínuo. Contudo, após a adição constante, durante as seis primeiras horas de reação, de 3 mL de efluente no ensaio descontínuo alimentado, a diferença final da atividade hidrolítica foi de 47,56% em relação ao processo descontínuo. Este fato também pode ser consequência de haver produção e consumo simultâneos de ácidos graxos livres no meio reacional, pois os microrganismos presentes no próprio efluente podem utilizar os ácidos graxos liberados na hidrólise como substrato, reduzindo sua concentração no meio (LEAL; FREIRE e SANT'ANNA JR., 2002).

**Tabela 21.** Atividade hidrolítica do efluente da indústria Micos Cicopal Ltda. pela lipase comercial Amano lipase PS - *Burkholderia cepacia* durante 24 h de reação, em processo descontínuo e descontínuo alimentado.

Tempo (h)	Atividade hidrolítica (U.mL <sup>-1</sup> )	
	Descontínuo	Descontínuo Alimentado
0,5	0,150 <sup>Aa</sup> ± 0,000	0,175 <sup>Ab</sup> ± 0,003
1	0,200 <sup>Ba</sup> ± 0,000	0,233 <sup>Bb</sup> ± 0,007
2	0,225 <sup>Ba</sup> ± 0,008	0,233 <sup>Ba</sup> ± 0,007
3	0,325 <sup>Ca</sup> ± 0,008	0,233 <sup>Bb</sup> ± 0,007
4	0,333 <sup>Ca</sup> ± 0,017	0,233 <sup>Bb</sup> ± 0,007
5	0,367 <sup>Ca</sup> ± 0,017	0,258 <sup>Cb</sup> ± 0,005
6	0,417 <sup>Da</sup> ± 0,017	0,258 <sup>Cb</sup> ± 0,005
7	0,492 <sup>Ea</sup> ± 0,025	0,258 <sup>Cb</sup> ± 0,005
8	0,492 <sup>Ea</sup> ± 0,025	0,258 <sup>Cb</sup> ± 0,005
24	0,492 <sup>Ea</sup> ± 0,025	0,258 <sup>Cb</sup> ± 0,005

\*Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam que houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade e letras minúsculas diferentes em cada linha idem.

No processo descontínuo, o aumento da hidrólise ao longo das 24 h de reação, evidenciou outro aspecto importante, que o substrato não inibiu a enzima, mesmo em alta concentração. O processo descontínuo pode levar a baixos rendimentos e/ou produtividades, quando o substrato adicionado de uma só vez no início da reação exerce efeitos de inibição, ou repressão (CARVALHO; SATO 2001a). No caso desta pesquisa esse efeito não foi observado, pelo contrário, o processo descontínuo favoreceu consideravelmente a hidrólise dos triacilglicerídeos do efluente industrial quando comparada ao processo descontínuo alimentado. Portanto, para o tratamento do efluente da indústria Micos Cicopal Ltda., o processo descontínuo em pH 7,5, concentração de enzima de 0,12 g.mL<sup>-1</sup> e 7,5% de goma arábica a 7% e 3 h de reação de hidrólise foram as melhores condições para se obter a hidrólise dos triacilglicerídeos presentes no efluente.

## 6 CONCLUSÃO

- Na pré-seleção de microrganismos com capacidade hidrolítica, dos quarenta microrganismos estudados, trinta e nove apresentaram formação de halo opaco, resultante da hidrólise da tributirina por enzimas. O melhores resultados obtidos foram da *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, do *Bacillus sp* NRRL 41094, do *Penicillium lanosum* NRRL 3442 e do *Corynebac glutamii*;
- Na fermentação em meio líquido a *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 foi o microrganismos que apresentou maior produção de lipases extracelulares.
- A produção de lipase da *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 por fermentação submersa foi favorecida em concentrações de 20 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho e 3 g.L<sup>-1</sup> de nitrato de sódio.
- Na caracterização das lipases do extrato enzimático e da lipase comercial de *Burkholderia cepacia*, os melhores resultados foram encontrados a 37°C e pH 8,0. Foram estáveis a 40°C, e termossensíveis a 50 e 60°C. A inativação das lipases seguiu modelo de desnaturação de primeira ordem.
- As melhores condições para a hidrólise do efluente industrial estudado foram utilizando processo descontínuo, em pH 7,5, concentração de enzima de 0,12 g.mL<sup>-1</sup>, 7,5% de goma arábica a 7% e em tempo de reação de 3 h, o que proporcionou maior hidrólise dos triacilglicerídeos.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, M. R. M. P.; NOVAES, A. C.; GUARINO, A. W. S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1145-1154, 2002.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. APHA. Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of Methods for microbiological examination of foods**. Washington: APHA, 2005.

ANNAMALAI, N.; ELAYARAJA, S.; VIJAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T. Thermostable, alkaline tolerant lipase from *Bacillus licheniformis* using peanut oil cake as a substrate. **African Journal of Biochemistry Research**, Nairobi, v. 5, n. 6, p. 176-181, 2011.

ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical Journal**, Colchester, v. 343, p. 177-183, 1999.

AS LIPASES. Disponível em:

[http://extras.ufg.br/uploads/101/original\\_diss\\_sejana.pdf](http://extras.ufg.br/uploads/101/original_diss_sejana.pdf). Acesso em: 21 de jan. 2011.

BANDMANN, N.; COLLET, E.; LEIJEIN, J.; UHLÉN, M.; VEIDE, A.; NYGREN, P.A. Genetic engineering of the *Fusarium solani* pisi lipase cutinase for enhanced partition in PEG-phosphate aqueous two phase system. **Journal of Biotechnology**, Amsterdã, v. 79, p. 161-172, 2000.

BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R. R. Substâncias enantiomericamente puras (sep): a questão dos fármacos quirais. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 647-656, 1997.

BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties – a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 15-29, 2010.

BIER, M.; COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. Lipases. In: \_\_\_\_\_. **Methods in Enzymol.** New York: Academic Press, 1995, v. 1, p. 627-642.

BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A.M.; DEREWENDA, Z.S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J.P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, New York, v. 343, p. 767-770, 1990.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Lei nº 9.433, de 8 de janeiro de 1997**. Institui a política nacional de recursos hídricos, cria o sistema nacional de gerenciamento de recursos hídricos. Brasília, DF: CONAMA, 1997. p. 470.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água superficiais, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Brasília, DF: CONAMA, 2005. 24 p.

BROCKMAN, H. L.; BORGSTROM, B. General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: **Lipases**, p. 3-47. Amsterdã: Elsevier Science Publishers, 1984.

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, Amsterdã, v. 97, p. 2195-2210, 2006.

CAMPOS, C. M. M.; DAMASCENO, L. H. S.; MOCHIZUKI, E. T.; BOTELHO, C. G. Avaliação do desempenho do reator anaeróbico de manta de lodo (UASB) em escala laboratorial na remoção da carga orgânica de águas residuárias da suinocultura. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 2, p. 390-399, 2005.

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

CASTRO-OCHOA, L. D.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R.O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdã, v. 37, p. 648-654, 2005.

CARDENAS, F.; ALVAREZ, E.; CASTRO-ALVAREZ, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S. W.; SINISTERRA, J. V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdã, v. 14, p. 111-123, 2001.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. 2. ed. Brasil: Edgard Blucher, 2001. Cap. 9, p. 193-204.

CASTIGLIONI, G. L. **Estudo da produção e utilização de lipase de *Burkholderia cepacia* na síntese enzimática de biodiesel**. 2009. 180p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, 2009.

CHAHINIAN, H.; VANOT, G.; IBRICK, A.; RUGANI, N.; SARDA, L.; COMEAU, L. C. Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium* purification and characterization of a partial acylglycerol lipase. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 64, n.2, p. 215-222, 2000.



COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-production fungi from Brazil savanna soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 22, p. 881-885, 2005.

COENYE, T.; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R. W.; LIPUMA, J. J. Minireview: taxonomy and identification of the Burkholderia cepacia complex. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 10, p. 3427-3436, 2001.

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

COSTA, A. C. R.; CAMELO, G. L. P.; SOUZA, S. S.; MAIA, S. S. A gestão ambiental influenciando o desempenho competitivo das empresas exportadoras. **Holos**, Rio Grande do Norte, v. 3, p. 185-194, 2007.

DEIVE, F.J.; COSTAS, M.; LONGO, M.A. Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, Washington, v. 25, p. 1403-1406, 2003.

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

DHARMSTHITI, S.; KUHASUNTISUK, B. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 21, p. 75-80, 1998.

DOMINGUEZ, A.; COSTAS, M.; LONGO, M. A.; SANROMÁN, A. A novel application of solid culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, Washington, v. 25, p. 1225-1229, 2003.

DUEHOLM, T.E.; ANDREASEN, K.H.; NIELSEN, P.H. Transformation of lipids in activate sludge. **Water Science and Technology**, London, v. 73, n. 1, p. 165-172, 2001.

ELIBOL, M.; ÖZER, D. Lipase production by immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, Amsterdã, v. 36, p. 219-223, 2000.

ERTUĞRUL, S.; DÖNMEZ, G.; TAKAÇ, S. Isolation of lipase producing *Bacillus sp.* from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdã, v. 149, p. 720-724, 2007.

EXCEL FOR WINDOWS. **Software version 7: Microsoft Corporation**, USA, 2009.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2007. 120p. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Paraná (UFP), Curitiba, 2007.

FREIRE, D. M. G. **Seleção de microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum***. 1996. 174p. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 1996.

FREIRE, D. M.; TELES, E. M. F.; BOM, E. P. S.; SANT'ANNA JR., G. L. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter: effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Washington, v. 63-65, n. 1, p. 409-421, 1997.

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

GOLDBECK, R. **Triagem, produção e avaliação da atividade da enzima lipase a partir de leveduras silvestres**. 2008. 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

GONÇALVES, F. A. G. **Produção de lipase extracelular por leveduras de cultivo submerso**. 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

GRIEBELER, N.; POLLONI, A.; REMONATTO D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; CECHET, J.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R.; RIGO, E.; NINOW, J. Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. **Food Bioprocess Technology**, Washington, v. 4, n. 4, p. 578–586, 2009.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Washington, v. 34, p. 762-781, 2004.

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

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

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications - an overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Washington, v. 118, p. 155-170, 2004.

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. Biochemical Nomenclature Committees. **Enzyme nomenclature**. London: IUBMB, 2009. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/jcfn/index.html#6>. Acesso em: 21 jan. 2011.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. **Trends and Biotechnology**, Amsterdã, v. 16, p. 396-403, 1998.

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

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

JEGANATHAN, J.; BASSI, A.; NAKHLA, G. Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation. **Journal of Hazardous Materials B**, Porto, v. 137, p. 121-128, 2006.

JEGANATHAN, J.; NAKHLA, G.; BASSI, A. Hydrolytic pretreatment of oily wastewater by immobilized lipase. **Journal of Hazardous Materials B**, Porto, v. 145, p. 127-135, 2007a.

JEGANATHAN, J.; NAKHLA, G.; BASSI, A. Oily wastewater treatment using a novel hybrid PBR-UASB system. **Chemosphere**, Amsterdã, v. 67, p. 1492-1501, 2007b.

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

JINWAL, U. K.; ROY, U.; CHOWDHURY, A. R.; BHADURI, A. P.; ROY, P. K. Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Pseudomonas mendocina* PK-12CS and chemoselective hydrolysis of fatty acid ester. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Amsterdã, v. 11, p. 1041-1046, 2003.

JUNG, F.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Impact of enzymatic pre-hydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters. **Biotechnology Letters**, Washington, v. 24, p. 1797-1802, 2002.

KADEMI, A.; AÏT-ABDELKADER, N.; FAKHREDDINE, L. Purification and characterization of a thermostable esterase from the moderate thermophile *Bacillus circulans*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Washington, v. 54, n. 2, p. 173-179, 2000.

KUROIWA-TRZMIELINA, J. **Atividade quimiopreventiva da tributirina na hepatocarcinogênese em ratos**. 2007. 161p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, New York, v. 227, p. 680-685, 1970.

- LAI, D. T.; MACKENZIE, A. D.; O'CONNOR, C. J.; TURNER, K. W. Hydrolysis characteristics of bovine milk fat and monoacid triglycerides mediated by pregastric lipase from goats and kids. **Journal of Dairy Science**, Amsterdã, v. 80, n. 10, p. 2249-2257, out. 1997.
- LAN, D.; YANG, N.; WANG, W.; SHEN, Y.; WANG, Y. A novel cold-active lipase from *Candida albicans*: cloning, expression and characterization of the recombinant enzyme. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 12, p. 3950-3965, 2011.
- LEAL, M. C. M. R.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA JR., G. L. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brazilian Journal Chemical Engineering**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 175-180, 2002.
- LEAL, M. C. M.R.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C.; SANT' ANNA JR. G. L. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. **Process Biochemistry**, Amsterdã, v. 41, p. 1173-1178, 2006.
- LEE, S. Y.; RHEE, J. S. Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. **Enzyme Microbial Technology**, Amsterdã, v. 15, p. 617-623, 1993.
- LEHNINGER, A. L. **Princípios da Bioquímica**, 2. ed. São Paulo: Savier, 1986.
- LI, N.; ZONG, M. Review: lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdã, v. 66, p. 43–54, 2010.
- LIMA JÚNIOR, A. F.; DEMONER, H. F.; CASSINI, S. T. A.; GONÇALVES, R. F. Biodegradabilidade aeróbia de resíduos oleosos derivados de sistemas de tratamento de esgoto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 24. 2007, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2007. p. 1-7.
- LIMA, V. G. M.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; FONTANA, J. D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdã, v. 18, p. 65–71, 2004.
- LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M. I. M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Effect of the nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*, **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 41, p. 105-110, 2003.
- LINKO, Y. Y.; LAMSA, M.; UOSUKAINEN, E.; SEPPALLA, J.; LINKO, P. Biodegradable products by lipase biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, Amsterdã, v. 66, p. 41-50, 1998.

- MACEDO, G. A.; PARK, Y. K.; PASTORE, G. M. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 28, p. 90-95, 1997.
- MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 1942-1947, 2008.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. Redução do teor de lipídeos presentes em efluentes das indústrias de produtos lácteos empregando lipases pancreáticas. **Revista Saúde e Ambiente** (Health and Environment Journal), Joinville, v. 5, n. 1, p. 31-39, 2004.
- MENDES, A. A.; FREITAS, L.; CASTRO, H. Biodegradabilidade anaeróbia de lipídeos e proteínas presentes em efluentes das indústrias de laticínios empregando enzimas comerciais. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 6., 2004, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Biotecnologia, 2004. p. 299.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; FURIGO JÚNIOR, A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídios. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.
- MILLER, C.; AUSTIN, H.; POSORSKE, L.; GONZLEZ, J. Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Berlin, v. 65, n. 6, p. 927-931, 1988.
- MUKHERJEE, K. D.; KIEWITT, I. Substrate specificity of lipases in protease preparations. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 6, p. 2427-2432, 1998.
- OH, B. C.; KIM, H. K.; LEE, J. K.; KANG, S. C.; OH, T. K. *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrato especificity and gene cloning. **FEMS Microbiological Letters**, Amsterdã, v.179, p. 385-392, 1999.
- PADILHA, G. S. **Caracterização, purificação e encapsulamento de lipase de *Burkholderia cepacia***, 2010. 126p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, 2010.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.
- PARODI, P.W. Cow's milk fat components as potential anticarcinogenic agents. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 127, n. 6, p. 1055–1060, jun. 1997.
- PARUL, J.; SULAKSHANA, J.; GUPTA, M. N. A microwave-assisted microassay for lipases. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Washington, v. 381, p. 1480-1482, 2005.

PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F.; FURIGO, A.. Hidrólise enzimática do efluente proveniente de frigorífico avícola empregando lipase de *Candida rugosa*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14., 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

QUÉMÉNUER, M.; MARTY, Y. Fatty acids and sterols in domestic wastewater. **Water Research**, Amsterdã, v. 28, p. 1217-1226, 1994.

RAHMAN, R. N. Z.; BAHARUM, S. N.; BASRI, M.; SALLEH, A.B. High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas sp.* strain S5. **Analalytical Biochemmistry**, Amsterdã, v. 341, p. 267-274, 2005.

RAMANI, K.; KENNEDY, L. J.; RAMAKRISHNAN, M. SEKARAN, G. Purification, characterization ans application os acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. **Process Biochemistry**, Amsterdã, v. 45, p. 1683-1691, 2010.

RIGO, E.; RIGONI, R. E.; LODEA, P.; OLIVEIRA, D.; FREIRE, D. M. G.; DI LUCCIO, M. Application of different lipases as pretreatment in anaerobic treatment of wastewater. **Environmental Engineering Science**, New Rochelle, v. 25, n. 9, p. 1243-1249, 2008.

RODRIGUES, K.; VIDAL, C. B.; ANDRADE, M. V. F.; PESSOA-WANDERLEY, C. R.; DUARTE, I. C. S.; MARINHO, G. Influência da glicose e da concentração do inóculo fúngico no tratamento de efluente da castanha de caju. **Conexões - Ciência e Tecnologia**, Fortaleza, v. 4, n. 1, p. 41-51, 2010.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 126-131, 2010.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004, 416 p.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Research review paper: production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, Amsterdã, v. 19, p. 627–662, 2001.

SHIRAZI, S.H.; RAHMAN, S.R.; RAHMAN, M.M. Short communication: production of extracellular lipases by *Saccaromyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Washington, v. 14, p. 595-597, 1998.

SOUTO, L. R. F. **Utilização do amido da casca de mandioca na produção de vinagre: características físico-químicas e funcionais**. 2011. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

STATISTICA FOR WINDOWS. **Software version 7: Statsoft**, Tulsa, OK, USA, v.2 licenciado n. 1101, 2004.

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**, Amsterdã, v. 105, p. 228-235, 2010.

SVENDSEN, A.; BORCH, K.; BARFOED, M.; NIELSEN, TB.; GORMSEN, E.; PATKAR, S. A. Biochemical properties of cloned lipases from the *Pseudomonas* family. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdã, v. 9, n. 17, p. 1259, 1995.

TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C. DENG, L. Screening of high lipase producing *Candida sp.* and production of lipase by fermentation. **Process Biochemistry**, Amsterdã, v. 39, p. 459-465, 2003.

TAKEDA, Y.; AONO, R.; DOUKYU, N. Purification, characterization, and molecular cloning of organic-solvent-tolerant cholesterol esterase from cyclohexane-tolerant *Burkholderia cepacia* strain ST-200. **Extremophiles**, Washington, v. 10, n. 4, p. 269-277, 2006

THE SAS SYSTEM for Windows 3.95 – Release 6.08. **SAS Institute**, Inc. Cary, NC, USA, 1992.

TISS, A.; CARRIÉRI, F.; DOUCHET, I.; PATKAR, S.; SVENDSEN, A.; VERGER, R. Interfacial binding and activity of lipases at the lipid-water interface: effects of gum arabic and surface pressure. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdã, v. 26, p. 135-145, 2002.

TRAUB, P. C.; SCHMIDT-DANNERT, C.; SCHMITT, J.; SCHMID, R. D. Gene synthesis, expression in *E. coli*, and in vitro refolding of *Pseudomonas sp.* KWI 56 and *Chromobacterium viscosum* lipases and their chaperones. **Applied Microbiology Biotechnology**, Washington, v. 55, n. 2, p. 198-204, 2001.

TURKI, S.; AYED, A.; CHALGHOUMI, N.; WEEKERS, F.; THONART, P.; KALLEL, H. An enhanced process for the production of a highly purified extracellular lipase in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Washington, v. 160, p. 1371-1385, 2010.

VALENTE, A. M.; ALEXANDRE, V. M.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Pré-hidrólise enzimática da gordura de efluente da indústria de pescado objetivando o aumento da produção de metano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 483-488, 2010.

VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. **Tibtech**, v. 15, p. 32-38, 1997.

ZAREVÚCKA, M.; KEJIK, Z.; SAMAN, D.; WIMMER, Z.; DEMNEVORÁ. Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum*. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdã, v.37, p. 481-486, 2005.

ZHENG-YU, S.; JIANG-KE, Y.; YUN-JUN, Y. Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus niger* F044. **Chinese Journal of Biotechnology**, Beijing, v. 23, n. 1, p. 96-100, 2007.

WAKELIN N. G.; FORSTER C. F. An investigation into microbial removal of fats, oils and greases. **Bioresource Technology**, Amsterdã, v. 59, p. 37-43, 1997.

WANG, H.; LIU, R.; LU, F.; QI, W.; SHAO, J.; MA, H. A novel alkaline and low-temperature lipase of *Burkholderia cepacia* isolated from Bohai in China for detergent formulation. **Annals of Microbiology**, Washington, v. 59, n. 1, p. 105-110, 2009.

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

WASZCZYNSKYJ, N.; RAO, C. S.; DA SILVA, R. S. F. Extraction of proteins from wheat bran: application of carbohydrases. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 58, n. 4, p. 264-266, 1981.

WOLSKI, E. **Estudo comparativo da produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Penicillium sp.* livre e imobilizado**. 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2008.

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



## APÊNDICES

**APÊNDICE A** - Medidas dos raios das colônias (r), halos de lipólise (R) e relação R/r em meio de cultivo sólido com tributirina dos microrganismos isolados de efluentes industriais e urbanos e dos adquiridos em institutos de pesquisa.

Código	Raio (cm)		R/r
	Colônia (r)	Halo lipolítico (R)	
UCT	0,25 ± 0,10	0,29 ± 0,04	1,15
UCS	0,29 ± 0,09	0,34 ± 0,04	1,17
UZM	1,06 ± 0,05	0,18 ± 0,02	0,16
UEC	0,50 ± 0,07	0,09 ± 0,04	0,18
UKM	0,25 ± 0,03	0,29 ± 0,04	1,15
UKR	0,25 ± 0,06	0,35 ± 0,14	1,40
UBS14	0,38 ± 0,12	0,65 ± 0,06	1,70
UCG	0,33 ± 0,08	0,70 ± 0,13	2,10
UBS41	0,33 ± 0,05	0,76 ± 0,08	2,30
UPL	0,34 ± 0,05	0,72 ± 0,07	2,15
EA1	0,30 ± 0,08	0,41 ± 0,02	1,33
EA2	0,45 ± 0,03	0,10 ± 0,04	0,22
EB1	0,27 ± 0,06	0,50 ± 0,11	1,87
EB2	0,25 ± 0,02	0,47 ± 0,04	1,86
EB3	0,44 ± 0,04	0,48 ± 0,07	1,09
EB4	0,38 ± 0,05	0,11 ± 0,04	0,30
TEB1	0,29 ± 0,07	0,29 ± 0,04	1,00
TEB2	0,35 ± 0,11	0,41 ± 0,09	1,18
TEB3	0,25 ± 0,00	0,47 ± 0,06	1,86
TEB4	0,30 ± 0,07	0,31 ± 0,04	1,04
TEV1	0,30 ± 0,07	0,47 ± 0,08	1,53
TEV2	0,43 ± 0,16	0,46 ± 0,04	1,09
BC25416	0,24 ± 0,05	0,91 ± 0,05	3,76
TA1	0,28 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,08
TA2	0,30 ± 0,13	0,41 ± 0,04	1,38
TDB1	0,24 ± 0,05	0,10 ± 0,02	0,42
TDB2	0,40 ± 0,03	0,46 ± 0,04	1,16
TDB3	0,41 ± 0,18	0,19 ± 0,04	0,45
TDB4	0,38 ± 0,06	0,19 ± 0,07	0,50
TDB5	0,23 ± 0,07	0,34 ± 0,04	1,50
TV1	0,34 ± 0,04	0,41 ± 0,04	1,22
TV2	0,26 ± 0,11	0,36 ± 0,04	1,38
EV1	0,29 ± 0,04	0,28 ± 0,07	0,96
EV2	0,25 ± 0,04	0,31 ± 0,07	1,25
TB1	0,25 ± 0,06	0,35 ± 0,07	1,40
TB2	0,35 ± 0,11	0,68 ± 0,10	1,95
TB3	0,60 ± 0,08	0,23 ± 0,07	0,38
TB4	0,34 ± 0,12	0,29 ± 0,04	0,85
TEA1	0,26 ± 0,14	0,26 ± 0,04	1,00
TEA2	0,55 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00

UCT: *Candida tropicalis* CCT 5846; UCS: *Candida sp.*; UZM: *Zymomonas mobilis* CCT 4494; UEC: *Escherichia coli*; UKM: *Kluveromyces marxianus*; UKR: *Kocuria rhizophila*; UBS14: *Bacillus subtilis* NRRL 14819; UCG: *Corynebacterium glutamyl*; UBS41: *Bacillus sp* NRRL 41094; UPL: *Penicillium lanosum* NRRL 3442; IEA1 e IEA2: efluente industrial, tanque de entrada, meio PCA, microrganismo 1 e 2; IEB1 a IEB4: efluente industrial, esporos misto de bactérias e lipases, meio PCA, microrganismo 1 a 4; IEV1 e IEV2: efluente industrial, esporos misto de bactérias e lipases, meio VRBA, microrganismo 1 e 2; BC25416: *Burkholderia cepacia* ATCC 25416; ITEA1 e ITEA2: efluente industrial, tanque de equalização, meio PCA, microrganismo 1 e 2; ITEB1 a ITEB4: efluente industrial, tanque de equalização, meio AB, microrganismo 1 a 4; ITEV1 e ITEV2: efluente industrial, tanque de equalização, meio VRBA, microrganismo 1 e 2; ITA1 e ITA2: efluente industrial, tanque de tratamento, meio PCA, microrganismo 1 e 2; ITB1 a ITB4: efluente industrial, tanque de tratamento, meio AB, microrganismo 1 a 4; TV1 e TV2: tanque de tratamento, meio VRBA, microrganismo 1 e 2; ETDB1 a ETDB5: efluente da ETE, tanque de decantação, meio AB, microrganismo 1 a 5.

**APÊNDICE B** - Estimativa do efeito de cada nutriente adicionado ao meio de cultivo na resposta atividade enzimática da lipase de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416.

Fontes de variação	Efeito	Desvio padrão	t (11)	p-valor	Lim. Conf. -95%	Lim. Conf. +95%
Média	0,00528	0,001	5,103	0,00034	0,00300	0,00755
AMM	-0,00273	0,002	-1,243	0,23975	-0,00756	0,00210
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,00276	0,002	1,256	0,23517	-0,00207	0,00758
OS	-0,00220	0,002	-1,002	0,33794	-0,00703	0,00263
MgSO <sub>4</sub>	-0,00184	0,002	-0,840	0,41890	-0,00667	0,00299
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-0,0004	0,002	-0,186	0,85619	-0,00523	0,00442
NaNO <sub>3</sub>	0,00493	0,002	2,245	0,04632*	0,00010	0,00975

\*significativo ao nível de 5% de probabilidade. AMM: água de maceração de milho; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: fosfato monobásico de sódio; OS: óleo de soja; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: sulfato de magnésio heptahidratado; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: fosfato dibásico de potássio; NaNO<sub>3</sub>: nitrato de sódio.

**APÊNDICE C** - Análise de variância relativa aos diferentes nutrientes adicionados ao meio de cultivo sobre a resposta atividade enzimática da lipase de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416.

Fontes de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F <sub>calc</sub>	p-valor
AMM	1	0,000030	0,000030	1,545	0,2398
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	0,000030	0,000030	1,577	0,2352
OS	1	0,000019	0,000019	1,004	0,3379
MgSO <sub>4</sub>	1	0,000014	0,000014	0,705	0,4189
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	0,000001	0,000001	0,034	0,8562
NaNO <sub>3</sub>	1	0,000097	0,000097	5,039	0,0463*
Resíduo	11	0,000212	0,000019		
Total	17	0,000402			

\*significativo ao nível de 5% de probabilidade. AMM: água de maceração de milho; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: fosfato monobásico de sódio; OS: óleo de soja; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: sulfato de magnésio heptahidratado; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: fosfato dibásico de potássio; NaNO<sub>3</sub>: nitrato de sódio.

**APÊNDICE D** - Análise de variância para o modelo ajustado da atividade enzimática da lipase de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 em função do enriquecimento do meio de cultivo com água de maceração de milho (AMM) e nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>).

Fontes de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F <sub>calc</sub>	p-valor
AMM (Q)	1	0,000046	0,000046	19,320	0,0032**
NaNO <sub>3</sub> (L)	1	0,000005	0,000005	2,276	0,1751 <sup>ns</sup>
NaNO <sub>3</sub> (Q)	1	0,000044	0,000044	18,539	0,0035**
Resíduo	7	0,000017	0,000002		
Total	10	0,000092			

\*\* significativo a 1%; \* significativo a 5%; ns: não significativo.

**APÊNDICE E** - Coeficientes de regressão do modelo ajustado da atividade enzimática da lipase de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 em função do enriquecimento do meio de cultivo com água de maceração de milho (AMM) e nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>).

Fontes de variação	Coef. de regressão	Erro padrão	t (7)	p-valor	Lim. Conf. -95%	Lim. Conf. +95%
Média	0,010070	0,0009	11,26	< 0,0001**	0,0080	0,01258
AMM (Q)	-0,002864	0,0007	-4,40	0,0032**	-0,0044	-0,0013
NaNO <sub>3</sub> (L)	-0,000826	0,0006	-1,51	0,1751 <sup>ns</sup>	-0,0021	0,0005
NaNO <sub>3</sub> (Q)	-0,002806	0,0007	-4,31	0,0035**	-0,0044	-0,0013

\*\* significativo a 1%. \* significativo a 5%. ns: não significativo. R<sup>2</sup> = 0,81834. R<sup>2</sup><sub>aj</sub> = 0,74049.

**APÊNDICE F** - Efeito da temperatura na atividade enzimática das lipases de *Burkholderia cepacia*, nas temperaturas de 40, 50 e 60°C por 120 minutos.

Tempo (min)	Extrato Enzimático			Enzima Comercial		
	40°C	50 °C	60 °C	40°C	50 °C	60 °C
0	0,0120	0,0120	0,0120	0,1471	0,1471	0,1471
15	0,0118	0,0116	0,0113	0,1445	0,1410	0,1380
30	0,0114	0,0112	0,0100	0,1380	0,1260	0,1289
45	0,0110	0,0098	0,0090	0,1360	0,11563	0,1070
60	0,0107	0,009	0,0075	0,1287	0,1070	0,0980
120	0,0099	0,0075	0,0062	0,1180	0,0880	0,0725

**APÊNDICE G** - Efeito do pH na atividade enzimática das lipases de *Burkholderia cepacia*, na faixa de pH entre 7 e 9 a 37°C por 3 h.

Tempo (min)	Extrato Enzimático			Enzima Comercial		
	pH					
	7	8	9	7	8	9
0	0,0105	0,0196	0,0189	0,0089	0,0191	0,0186
15	0,0114	0,0198	0,0193	0,0096	0,0200	0,0189
30	0,0126	0,0203	0,0200	0,0100	0,0207	0,0193
45	0,0142	0,0210	0,0205	0,0110	0,0212	0,0200
60	0,0147	0,0212	0,0210	0,0121	0,0219	0,0205
90	0,0158	0,0221	0,0212	0,0137	0,0221	0,0210
120	0,0168	0,0226	0,0219	0,0149	0,0228	0,0210
180	0,0172	0,0233	0,0219	0,0154	0,0233	0,0212

**APÊNDICE H** - Análise de variância para o modelo ajustado da atividade hidrolítica sobre o efluente da Micos Cicopal Ltda. em função do potencial hidrogeniônico (pH), da concentração de enzima ([E]) e do volume de goma arábica a 7% (GA 7%) durante 30 min de hidrólise.

Fontes de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F <sub>calc</sub>	p-valor
pH (L)	1	0,004605	0,004605	28,006	0,00026 <sup>**</sup>
pH (Q)	1	0,001700	0,001700	10,342	0,00822 <sup>**</sup>
[E] (L)	1	0,001784	0,001784	10,847	0,00716 <sup>**</sup>
[E] (Q)	1	0,000946	0,000946	5,751	0,03535 <sup>*</sup>
GA 7% (L)	1	0,000230	0,000230	1,398	0,26203 <sup>ns</sup>
GA 7% (Q)	1	0,000946	0,000946	5,751	0,03535 <sup>*</sup>
Resíduo	11	0,001809	0,000164		
Total	17	0,011003			

\*\* significativo a 1%. \* significativo a 5%. ns: não significativo.



**APÊNDICE I** - Coeficientes de regressão do modelo ajustado da atividade hidrolítica sobre o efluente da Micos Cicopal Ltda. em função do potencial hidrogeniônico (pH), da concentração de enzima ([E]) e do volume de goma arábica a 7% (GA 7%) durante 30 min de hidrólise.

Fontes de variação	Coef. de regressão	Erro padrão	t (11)	p-valor	Lim. Conf. -95%	Lim. Conf. +95%
Média	0,032699	0,0064	5,11	0,00034**	0,0186	0,0468
pH (L)	-0,018371	0,0035	-5,29	0,00026**	-0,0260	-0,0107
pH (Q)	0,011612	0,0036	3,22	0,00822**	0,0037	0,0196
[E] (L)	0,011433	0,0035	3,29	0,00716**	0,0038	0,0191
[E] (Q)	0,008659	0,0036	2,40	0,03535*	0,0007	0,0166
GA 7% (L)	0,004101	0,0035	1,18	0,26203 <sup>ns</sup>	-0,0035	0,0118
GA 7% (Q)	0,008659	0,0036	2,40	0,03535*	0,0007	0,0166

\*\* significativo a 1%. \* significativo a 5%. ns: não significativo.  $R^2 = 0,83562$ .  $R_{aj} = 0,74595$ .

**APÊNDICE J** - Análise de variância do modelo completo de otimização da atividade hidrolítica sobre o efluente da Micos Cicopal Ltda. em função do potencial hidrogeniônico (pH), da concentração de enzima ([E]) e do volume de goma arábica a 7% (GA 7%) durante 3 h de hidrólise.

Fontes de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F <sub>calc</sub>	p-valor
pH (L)	1	0,00877	0,00877	6,601	0,0332*
pH (Q)	1	0,01654	0,01654	12,447	0,0078**
[E] (L)	1	0,00131	0,00131	0,985	0,3500 <sup>ns</sup>
[E] (Q)	1	0,01347	0,01347	10,135	0,0129*
GA 7% (L)	1	0,01122	0,01122	8,444	0,0197*
GA 7% (Q)	1	0,01159	0,01159	8,719	0,0184*
pH/[E]	1	0,00170	0,00170	1,280	0,2907 <sup>ns</sup>
pH/GA 7%	1	0,01004	0,01004	7,550	0,0252*
[E]/GA 7%	1	0,00420	0,00420	3,161	0,1133 <sup>ns</sup>
Resíduo	8	0,01063	0,00133		
Total	17	0,07737			

\*\* significativo a 1%. \* significativo a 5%. ns: não significativo.

**APÊNDICE L** - Coeficientes de regressão do modelo completo da otimização da atividade hidrolítica sobre o efluente da Micos Cicopal Ltda. em função do potencial hidrogeniônico (pH), da concentração de enzima ([E]) e do volume de goma arábica a 7% (GA 7%) durante 3 h de hidrólise.

Fontes de variação	Coef. de regressão	Erro padrão	t (8)	p-valor	Lim. Conf. -95%	Lim. Conf. +95%
Média	0,331133	0,0182	18,19	0,00000**	0,2892	0,3731
pH (L)	0,025358	0,0099	2,57	0,03317*	0,0026	0,0481
pH (Q)	-0,036219	0,0103	-3,53	0,00775**	-0,0599	-0,0126
[E] (L)	0,009797	0,0099	0,99	0,35000 <sup>ns</sup>	-0,0130	0,0326
[E] (Q)	-0,032682	0,0103	-3,18	0,01293*	-0,0564	-0,0090
GA 7% (L)	0,028680	0,0099	2,91	0,01971*	0,0059	0,0514
GA 7% (Q)	-0,030314	0,0103	-2,95	0,01835*	-0,0540	-0,0066
pH/[E]	0,014583	0,0129	1,13	0,29066 <sup>ns</sup>	-0,0151	0,0443
pH/GA 7%	-0,035417	0,0129	-2,75	0,02515**	-0,0651	-0,0057
[E]/GA 7%	0,022917	0,0129	1,78	0,11331 <sup>ns</sup>	-0,0068	0,0526

\*\* significativo a 1%. \* significativo a 5%. ns: não significativo.  $R^2 = 0,86256$ .  $R_{aj} = 0,70794$ .