UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

BRAZ DE SOUZA MAROTTI

Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação na hidrólise de óleos vegetais

Lorena

2016

BRAZ DE SOUZA MAROTTI

Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação na hidrólise de óleos vegetais

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos

Orientadora: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro

Versão Reimpressa e Corrigida

Lorena

Agosto, 2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Marotti, Braz de Souza
Seleção de espécies do gênero Penicillium produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação na hidrólise de óleos vegetais / Braz de Souza Marotti; orientadora Heizir Ferreira de Castro - ed. reimp., corr. - Lorena, 2016.
102 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química na Área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2016
Orientadora: Heizir Ferreira de Castro

1. Lipases. 2. Penicillium . 3. Células íntegras. 4. Hidrólise . 5. Óleos vegetais . I. Título. II. de Castro , Heizir Ferreira , orient.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por todas as bênçãos concedidas, por estar sempre guiando meus passos e me ajudando a superar meus limites.

À minha orientadora Professora Dra. Heizir Ferreira de Castro. Obrigado pela excelente orientação, por toda dedicação, broncas, conselhos e principalmente paciência. A você devo grande parte do meu aprendizado e amadurecimento pessoal e profissional. Ao professor Dr. Daniel Bonoto pela coorientação, apoio e conselhos para a elaboração deste trabalho. A professora Dra. Maria Eleonora por toda a contribuição no desenvolvimento deste estudo.

A minha mãe Maria Helena por todos esses anos quando, muita das vezes abriu mãos de seus próprios sonhos em prol dos meus. Não existem palavras que possam expressar o amor, respeito e admiração que sinto por você. Ao meu pai Braz Marotti, por estar presente nos momentos de dificuldade, meu maior exemplo profissional e acima de tudo um incentivador que carrega consigo os meus próprios sonhos. Palavras não bastam para expressar minha admiração pela sua pessoa. Dedico aos dois à conquista deste título.

Ao meu avô Sr. Pedro José e também a saudosa Dona Fia por ser meu maior exemplo de vida, de pessoa, com certeza um presente que Deus me deu.

A minha irmã Michelle por escutar meus desabafos, por estar sempre ao meu lado. Exemplo profissional e também de ser humano justo. Obrigado por ser tão presente em todos os momentos. Obrigado também ao meu cunhado Anderson pelos momentos de descanso abdicados para me auxiliar várias vezes em minha "jornada".

As minhas irmãzinhas Maria Cecília e Vitória pelas risadas e momentos de descontração. Aos meus amigos, ou como posso orgulhosamente dizer meus "irmãos" Lucas, Vinicius e Gabriel *in memorium*, por fazer parte da minha vida desde o início da minha caminhada e por toda a vida que virá, por todas as risadas, jogatinas e até conselhos profissionais e pessoais.

Aos amigos de bancada Karine, Lucas Martin, Dani, Lucas Ramos, Rafael "Pará", Annie e Pedro por todo companheirismos, e por me ajudarem em momentos de dificuldades. Agradeço imensamente a minha amiga Flavia. Obrigada por tudo, pelo companheirismo, incentivo, broncas, risadas, almoços, jantares, bebedeiras, um presente de Divinópolis para a vida.

Aos funcionários Rita, Sandra, Cida e Bia por me ajudarem nos momentos de dificuldades, e que com carinho e dedicação tornam possível a existência e funcionamento desta instituição.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido por meio de bolsa de estudo e a Escola de Engenharia de Lorena (EEL–USP), pelo apoio técnico.

A todos os familiares e amigos.

RESUMO

MAROTTI, B. S. **Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação na hidrólise de óleos vegetais.** 2016. 102 p – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2016.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de diferentes espécies de fungos filamentosos do gênero *Penicillium*, possuindo elevada expressão de atividade lipolítica (glicerol éster hidrolase – EC 3.1.1.3), para utilização na hidrólise de óleos vegetais. Na primeira etapa foi avaliado o crescimento de dez espécies isoladas de diferentes *habitats* empregando meio de cultura líquido sintético, contendo azeite de oliva como principal fonte de carbono. Os parâmetros de resposta adotados foram: crescimento de biomassa celular e atividade hidrolítica no micélio e no filtrado (extracelular) e por meio destes ensaios foi possível selecionar três espécies produtoras de lipase retida no micélio com elevada atividade (> 150 U/g), *P. italicum* AT4421, *P. janthinellum* CCT3162 e *P. purpurogenum* AT2008. A atividade ligada ao micélio mais elevada foi obtida para *P. italicum* (199,3±9,5 U/g) o qual também apresentou a menor atividade no filtrado, resultando em uma relação entre as atividades ligadas ao micélio e extracelular da ordem de 10 vezes. As lipases das outras duas espécies também apresentaram baixas atividades no filtrado, correspondendo a proporções de atividades micélio/extracelular entre 9 a 7, a saber: *P. purpurogenum* (8,7), *P. janthinellum* (7,8). A determinação das propriedades bioquímicas e cinéticas das lipases dos fungos selecionados revelou valores similares de atividades máximas, abrangendo a faixa de temperatura e pH de 35-45 °C e 7-7,5, respectivamente. Os valores de Km variaram de 123,6 a 151,3 mM e os valores de V_{max} entre 387,6 e 539,1 µmol/min. Quanto à estabilidade térmica verificou-se que lipase de *P. janthinellum* foi a menos estável a 50 °C ($t_{1/2}$ = 0,92 h) e a *P. purpurogenum* a mais estável ($t_{1/2}$ = 1,21 h). Testes de hidrólise de óleos vegetais com diferentes composições em ácidos graxos foram efetuados para determinar a especificidade de cada lipase por ácido graxo. Para a lipase da espécie *P. purpurogenum* a maior porcentagem de hidrólise foi obtida quando utilizado óleo de coco, resultando em 60,6±0,6% em ácidos graxos livres. Ambas as lipases de *P. italicum* e *P. janthinellum,* revelaram elevada especificidade para óleos vegetais contendo ácido oleico como componente majoritário, como o óleo de canola, resultando em graus de hidrólise de 77,1±1,9% e 60,3±1,9% respectivamente. Para todas as lipases testadas, a concentração adequada do substrato foi estabelecida em 25% m/m (3:1 razão água/óleo) e a utilização de ondas ultrassonoras forneceu incrementos de pelo menos 1,2 vezes no grau de hidrólise em curto período de tempo (5 a 8 h). A composição dos hidrolisados por cromatografia gasosa indicam que as lipases das três espécies selecionadas foram capazes de enriquecer o meio com ácidos graxos obedecendo a composição de suas respectivas matérias-primas lipídicas. Para as lipases de *P. italicum* e *P. janthinellum* utilizando o óleo de canola, os ácidos graxos liberados foram basicamente insaturados, sendo que aproximadamente 50% desse material foi composto por ácido oleico (C18:1). Para a lipase de *P. purpurogenum* utilizando o óleo de coco, a composição de seu hidrolisado foi aproximadamente 50% de ácido láurico (C12:0). Potenciais aplicações deste procedimento são as reações de hidrólises de óleos vegetais para obtenção de concentrados de ácidos graxos de alto valor agregado (ômega 6), pré-tratamento de efluentes da indústria alimentícia e uma excelente alternativa na utilização em reações de hidroesterificação para produção de biocombustíveis utilizando matérias-primas de baixa qualidade.

Palavras-chave: Lipases, *Penicillium*, Células Íntegras, Hidrólise, Óleos Vegetais

ABSTRACT

MAROTTI, B. S. **Screening of species from the genus *Penicillium* producing mycelium bound lipases to be applied in the hydrolysis of vegetable oils**. 2016. 102 p – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2016.

The aim of this study was to evaluate the potential of different species from filamentous fungi the genus *Penicillium*, with high expression in lipolytic activity (glycerol ester hidrolase EC 3.1.1.3), for using in the hydrolysis of vegetable oils. Ten species of *Penicillium* genus, isolated from different habitats, were growth in synthetic liquid medium containing olive oil as main carbon source, and the selection was based on the following parameters: biomass growth and hydrolytic activities attained in the mycelium bound and filtrate (extracellular). Under these conditions, three lipases producing species (*P. italicum* AT4421*, P. janthinellum* CCT3162 *and P. purpurogenum* AT2008) were selected by retaining high activity in the mycelium (> 150 U/g) and lower activity in the filtrate. *P. italicum* was found to have the highest lipase mycelium-bound activity (199.3±9.5 U/g) lower filtrate activity (mycelium-bound and extracellular activity ratio of 10-fold). The other species also showed low filtrate lipolytic with mycelium-bound and extracellular activity ratios of 8.7 and 7.8-fold for *P. purpurogenum* and *P. janthinellum*, respectively. The determination of biochemical and kinetic properties of the lipases resulted in similar maximum activities at pH and temperature range of 35-45ºC and 7-7.5, respectively. Values for Km varied from 123.6 to 151.3 mM and V_{max} values between 387.6 and 539.1 µmol/min. The thermal stability assays showed that lipase of *P. janthinellum* was less stable at 50 °C ($t_{1/2}$=0.92h) and *P. purpurogenum* was the most stable ($t_{1/2}$=1.21h). The selected mycelium-bound lipases were assayed in the hydrolyis of vegetable oils having different fatty acids composition. This allowed determining for each lipase its selectivity for fatty acids. According to the results, *P.purpurogenum* lipase was found to have the highest hydrolysis percentage with saturated vegetable oils, such as coconut oil attaining 60.6±0.6% of free fatty acids. Both *P. italicum and P. janthinellum* lipases showed high selectivity for vegetable oil rich in oleic acid, such as canola oil, resulting in hydrolysis degrees of 77.1 ± 1.9% and 60.3±1.9%, respectively. For all tested lipases suitable substrate concentration was established at 25% w/w (3:1 water/oil ratio) and the use of ultrasound irradiations provided increments in the degree of hydrolysis of at least 1.2 fold in short period of time (5 to 8 h). The hydrolysate composition determined by gas chromatography indicated that all the three selected lipases were able to enrich the medium with fatty acids according to their respective lipid raw materials. For the lipase from *P. italicum* and *P. janthinellum* using canola oil, the fatty acids released were basically unsaturated, and approximately 50% of this material was composed of oleic acid (C18:1). For the lipase from *P. purpuro*genum using coconut oil, its composition was approximately 50% hydrolysate of lauric acid (C12:0). Potential applications of this procedure are the hydrolysis of vegetable oils for obtaining high valuable fatty acids (omega 6), pretreatment of wastewater from food industries and an excellent alternative in hidroesterification reactions to biofuel production using low-quality raw materials.

Key words: Lipases, *Penicillium*, Whole-cells, Hydrolysis, Vegetable Oils

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Emprego de enzimas, abzimas e sinzimas na indústria de biocatalisadores, terapia, síntese, análise e proteção ambiental 19

Figura 3.2. Reações típicas catalisadas por lipases 20

Figura 3.3. Mecanismo catalítico de lipases baseado na "tríade catalítica" de *Candida rugosa*.....21

Figura 3.4. Fluxograma genérico do processo de produção enzimática extracelular.....30

Figura 3.5. Velocidade de reação de hidrólise (v) em função da concentração do substrato (s) parcialmente solúvel em água. Linhas verticais representam a solubilidade máxima ou concentração miscelar crítica do substrato (éster) usado.....36

Figura 3.6. Fluxograma do processo de hidroesterificação enzimática.....42

Figura 4.1. Esquema das reações de hidrólise 47

Figura 4.2: Esquema das reações de hidrólise acopladas ao banho ultrassônico.....47

Figura 5.1: Fluxograma da sequência experimental efetuada 51

Figura 5.2. Influência do pH na atividade lipolítica das lipases ligadas ao micélio de *P. italicum* (a), *P. janthinellum* (b) e *P. purpurogenum* (c). 54

Figura 5.3. Influência da temperatura na atividade lipolítica das lipases de *P. italicum* (a), *P. Janthinellum* (b) e *P. purpurogenum* (c).....56

Figura 5.4. Estabilidade térmica (50 ^{o}C) das lipases ligadas ao micélio de *P. italicum* (a), *P. janthinellum (*b*) e P. purpurogenum* (c).....58

Figura 5.5. Influência da concentração do substrato na atuação das lipases ligadas ao micélio de *P. italicum* (a), *P.janthinellum* (b), *P.purpurogenum* (c). 60

Figura 5.6. Perfil da porcentagem de hidrólise enzimática de diferentes óleos vegetais empregando a lipase da espécie *P. italicum*: (a) canola, (b) coco, (c) macaúba, (d) palma, (e) soja.....63

Figura 5.7. Perfil da porcentagem de hidrólise enzimática de diferentes óleos vegetais empregando a lipase da espécie *P. janthinellum* (a) canola, (b) coco, (c) macaúba, (d) palma, (e) soja. 66

Figura 5.8. Perfil da porcentagem de hidrólise enzimática de diferentes óleos vegetais empregando a lipase da espécie *P. purpurogenum*. (a) canola, (b) coco, (c) macaúba, (d) palma. 68

Figura 5.9. Seletividade das lipases testadas para óleos vegetais contendo diferentes composições em ácidos graxos (canola, coco, macaúba, palma e soja): lipase de *P. italicum* (a), lipase de *P. janthinellum* (b), lipase *P. purpurogenum* (c). 69

Figura 5.10. Perfis de hidrólises utilizando as lipases das espécies *P. italicum* e óleo de canola (a), *P. janthinellum* e óleo de canola (b) e *P. purpurogenum e* óleo de coco (c) sob aquecimento convencional (circulo aberto) e sob irradiação de ultrassom (circulo fechado). 71

Figura 5.11. Perfil da hidrólise do óleo de canola para diferentes proporções óleo e água (25%, círculo; 35%, quadrado e 50%, triângulo) conduzida a 40 °C sob irradiação de ultrassom utilizando a lipase de *P. italicum* 74

Figura 5.12: Perfil da hidrólise do óleo de canola para diferentes proporções óleo e água (25%, círculo; 35%, quadrado e 50%, triângulo) conduzida a 40 °C sob irradiação de ultrassom utilizando a lipase de *P. janthinellum* 75

Figura 5.13. Perfil da hidrólise do óleo de coco para diferentes proporções óleo e água (25%, círculo; 35%, quadrado e 50%, triângulo) conduzida a 40 °C sob irradiação de ultrassom utilizando a lipase de *P. purpurogenum*.....76

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Propriedades bioquímicas das lipases de diferentes espécies do gênero *penicillium*.....34

Tabela 4.2. Determinação do tempo de retenção dos ésteres metílicos 50

Tabela 5.1. Valores médios de concentração biomassa celular (g/L) e as atividades lipolíticas no filtrado e na biomassa para cada espécie de *Penicillum* após cultivo por 72 h em meio contendo óleo de oliva como fonte de carbono 52

Tabela 5.2. Faixas de valores de pH para cada lipase selecionada 55

Tabela 5.3. Faixas de temperatura de atuação das lipases das espécies selecionadas.....57

Tabela 5.4. Constantes cinéticas de Michaelis-Menten (Km) e velocidade máxima de reação (V*max*) determinadas de acordo com o sistema gráfico de Lineweaver-Burk 61

Tabela 5.5. Caracterização das lipases das espécies selecionadas utilizando como substrato óleo de oliva 61

Tabela 5.6. Composição em ácidos graxos dos diferentes óleos vegetais utilizados nos testes de determinação da especificidade das lipases.....62

Tabela 5.7. Perfil de acidez do meio reacional e do grau de hidrólise alcançado na reação de diferentes óleos vegetais utilizando a lipase da espécie *P. italicum* 64

Tabela 5.8. Perfil de acidez do meio reacional e do grau de hidrólise alcançado na reação de diferentes óleos vegetais utilizando a lipase da espécie *P. janthinellum* 67

Tabela 5.9. Perfil de acidez do meio reacional e do grau de hidrólise alcançado na reação de diferentes óleos vegetais utilizando a lipase da espécie *P. purpurogenum.* 68

Tabela 5.10. Melhores associações lipase/óleo vegetal em porcentagem de hidrólise 70

Tabela 5.11. Porcentagem de hidrólise de óleos vegetais mediadas por lipases das espécies selecionadas em diferentes sistemas de aquecimento convencional (8 horas de reação) e ultrassom (tempo para o alcance de máximo grau de hidrólise, marcado entre parenteses). 72

Tabela 5.12. Composição dos concentrados de ácidos graxos obtidos nos hidrolisados dos óleos de canola e coco empregando as lipases selecionadas.....73

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1. Classificação internacional das enzimas 18
Quadro 3.2. Espécies do gênero *Penicillium* produtores de lipases..... 25
Quadro 3.4. Efeito de diferentes indutores na produção de lipases em vários microrganismos. 33
Quadro 4.1. Principais equipamentos utilizados durante a realização do trabalho. 44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO....13
2 OBJETIVO....15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA....17
3.1 ENZIMAS....17
3.2 LIPASES....19
3.2.1 Mecanismo atuação das lipases....20
3.3 FONTES DE LIPASES....22
3.3.1 Lipases do gênero *Penicillium*....24
3.3.1.1 *Penicillium brevicompactum*....25
3.3.1.2 *Penicillium camemberti*....25
3.3.1.3 *Penicillium charlesii*....26
3.3.1.4. *Penicillium citrinum*....26
3.3.1.5 *Penicillium chrysogenum*....27
3.3.1.6 *Penicillium italicum*....27
3.3.1.7 *Penicillium janthinellum*....28
3.3.1.8 *Penicillium oxalicum*....28
3.3.1.9 *Penicillium roqueforti*....28
3.3.1.10 *Penicillium purpurogenum*....29
3.4 PRODUÇÃO DE LIPASES....29
3.4.1 Lipases extracelulares....29
3.4.2 Lipase ligada ao micélio....31
3.4.3 Fatores que influenciam a produção de lipases....32
3.5 PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E CINÉTICAS DAS LIPASES....33
3.6 APLICAÇÕES DE LIPASES....37
3.6.1 Aplicações de lipases em reações de hidrólise....38
4 MATERIAIS E MÉTODOS....43
4.1 MATERIAIS....43
4.1.1 Microrganismos....43
4.1.2 Reagentes....43
4.2 EQUIPAMENTOS....43
4.3 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL....44
4.3.1 Preparo do meio de cultura e inoculação....44
4.3.2 Testes de seleção das espécies de *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio....45
4.3.3 Determinação das propriedades bioquímicas e cinéticas....45
4.3.4 Reações de hidrólise de óleos vegetais....46
4.3.5. Estudo de alguns parâmetros de reações de hidrólise....47
4.3.5.1 Reações de hidrólise utilizando diferentes concentrações de substrato....48
4.3.6 Separação e recuperação dos produtos de hidrólise....48
4.4 MÉTODOS DE ANÁLISE....48
4.4.1 Determinação da atividade hidrolítica....48
4.4.2 Teor de umidade....49
4.4.3 Determinação dos ésteres de metila por cromatográfica gasosa....49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO....51
5.1 SELEÇÃO DOS FUNGOS PRODUTORES DE LIPASE LIGADAS AO MICÉLIO....52
5.2 DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E CINÉTICAS DAS LIPASES....53
5.2.1 Determinação do pH ótimo de atuação das lipases....53
5.2.2 Determinação da temperatura ótima de atuação das lipases....55
5.2.3 Determinação da estabilidade térmica das lipases de *Penicillium* avaliadas....57
5.2.4 Determinação dos parâmetros cinéticos das lipases ligadas ao micélio....59
5.3 HIDRÓLISE DE ÓLEOS VEGETAIS UTILIZANDO AS LIPASES DAS ESPÉCIES SELECIONADAS....62
5.3.1 Reações de hidrólise catalisada pela lipase de *Penicillium italicum*....62
5.3.2 Reações de hidrólise catalisada pela lipase de *Penicillium janthinellum*....65
5.3.3. Reações de hidrólise catalisada pela lipase de *Penicillium purpurogenum*....67

5.4 ESTUDO DE PARÂMETROS QUE INTERFEREM NAS REAÇÕES DE HIDRÓLISE 70
5.4.1 Efeito do uso de ultrassom 70
5.4.2 Efeito da proporção óleo e água na hidrólise de óleos vegetais 74
6 CONCLUSÕES 79
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 81
REFERÊNCIAS 83
APÊNDICES 95

1 INTRODUÇÃO

As lipases (glicerol éster hidrolases EC 3.1.1.3) fazem parte da classe das hidrolases que atuam na cadeia éster carboxílica e não requerem nenhum cofator. A função biológica primordial das lipases é catalisar a hidrólise de triacilgliceróis, entretanto, em condições em que a disponibilidade de água no meio é reduzida, a maioria das lipases é capaz de catalisar reações reversas como esterificação e transesterificação (interesterificação, alcoólise e acidólise), entre outras (RIBEIRO et al., 2011). Essa versatilidade e adaptabilidade em diferentes solventes tem resultado no uso difundido das lipases em diversas aplicações industriais (BON et al*.,* 2008). Usos importantes incluem a adição em formulação de detergentes, fabricação de aditivos alimentares; controle de pitch na indústria de papel e biocatalisadores para modificação de óleos e gorduras (DE CASTRO et al., 2010).

O aumento na aplicação industrial de enzimas lipases tem motivado pesquisas visando o isolamento e triagem de novas fontes de microrganismos lipolíticos. Uma das principais aplicações é na indústria oleoquímica, por meio da hidrólise de óleos vegetais. O mercado global de oleoquímicos alcançou cerca de 14 milhões de toneladas em 2012, segundo levantamento da consultoria LMC International. Os mercados globais de ácidos graxos e alcoóis graxos cresceram numa taxa de 9,1% e 4,4% ao ano entre 2008 e 2012, respectivamente, com projeções indicando um ritmo de crescimento de 3,8% e 3,3% entre 2012 a 2025. O mercado nacional de oleoquímicos básicos alcançou aproximadamente 400 mil toneladas em 2012, cerca de 3% do mercado global em volume. De acordo com os participantes na indústria, a perspectiva de crescimento do mercado de oleoquímicos no país é otimista. Isto está relacionado, em grande parte, a expectativa de crescimento dos principais mercados consumidores, a maior penetração dos oleoquímicos nesses mercados consumidores demonstrando ser um volume pequeno, porém, em constante crescimento (BAIN; COMPANY, 2014).

Convencionalmente, as transformações de óleos e gorduras são baseadas em processos químicos envolvendo o uso de catalisadores a altas pressões e temperaturas o que por sua vez pode ocasionar uma série de reações indesejáveis como oxidação, além da formação de subprodutos, exigindo etapas de separação e purificação. Desta forma, a hidrólise enzimática de óleos vegetais empregando lipases torna-se uma alternativa ao processo químico buscando superar os inconvenientes desta rota, obtendo produtos com

baixo custo energético por meio da condução da reação em condições mais amenas de temperatura e pressão (FREITAS et al., 2006).

As lipases podem ser produzidas por células animais, vegetais e microbianas. A maioria das lipases utilizadas em aplicações biotecnológicas é obtida por cultivo de microrganismos. Geralmente, essas enzimas são produtos extracelulares, embora haja indícios consideráveis de que essa atividade também esteja ligada ao micélio. As lipases ligadas aos micélios podem ser utilizadas diretamente, eliminando a necessidade de isolamento, purificação, imobilização da enzima, minimizando a perda da atividade enzimática (TORRES et al., 2003). No caso especifico da síntese de biocombustível a utilização direta do micélio (células íntegras) como biocatalisador é uma abordagem promissora, que favorece a redução do custo global do processo (YOSHIDA et al., 2012).

Entre os microrganismos produtores de lipase, os fungos filamentosos pertencentes às várias espécies dos gêneros *Aspergillus* (ADINARAYANA et al., 2004), *Rhizopus* (BAN et al., 2001), *Penicillium* (DHEEMAN et al., 2011); *Mucor* (ANDRADE, 2012) e *Trichoderma* (KASHMIRI et al., 2006) são descritos como potenciais produtores de lipase ligadas ao micélio.

Trabalhos anteriormente desenvolvidos no Laboratório de Biocatálise da EEL-USP avaliaram o desempenho de diferentes fungos filamentosos como produtores de lipases, entre os quais os gêneros *Mucor* e *Penicillium* obtiveram desempenhos destacados com relação à atividade lipolítica ligada ao micélio (ANDRADE, 2012). Entretanto, estudos detalhados só foram desenvolvidos para o fungo *Mucor circinelloides* (ANDRADE et al., 2012; ANDRADE et al., 2014) apesar do desempenho satisfatório obtido pelo fungo *Penicillium citrinum* com relação à atividade lipolítica ligada ao micélio, motivando assim a exploração desse potencial anteriormente identificado.

No presente trabalho o enfoque foi direcionado para o gênero *Penicillum* considerado como produtor da enzima lipase, contando com aproximadamente 30 espécies já relatadas na literatura com habilidade de produzir lipases com diferentes propriedades e especificidades possibilitando aplicações diversas (LI; ZONG, 2010). Adicionalmente enzimas como Lipase G Amano 50 produzida pela espécie *P. camemberti* e lipase R® Amano produzida pela espécie *P. roqueforti* estão disponíveis comercialmente encontrando diversas aplicações em biocatálise (MENDES et al., 2011).

Para o desenvolvimento deste trabalho foram avaliadas dez espécies do gênero *Penicillium* isoladas de diferentes *habitats* quanto ao potencial de aplicação em biocatálise como fornecedoras de lipases ligadas ao micélio.

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo selecionar espécies do gênero *Penicillium* com elevada expressão de atividade lipolítica (glicerol éster hidrolase – EC 3.1.1.3) para serem utilizadas na reação de hidrólise de óleos vegetais. Para o desenvolvimento desse estudo as seguintes atividades foram desenvolvidas, que podem ser consideradas como objetivos específicos:

- Selecionar espécies do gênero *Penicillium* provenientes da Coleção do Laboratório de Processos Biotecnológicos e Purificação de Macromoléculas da Universidade Federal de São João del Rei, tomando como parâmetro a atividade lipolítica contida na biomassa celular;

- Determinar as propriedades bioquímicas e constantes cinéticas destas lipases, visando verificar a potencialidade dessas enzimas em reações de hidrólise;

- Testar a aplicabilidade das lipases selecionadas em reações de hidrólise utilizando óleos vegetais contendo diferentes composições em ácidos graxos;

- Estabelecer condições adequadas de atuação das lipases selecionadas em reações de hidrólise de óleos vegetais específicos para cada lipase sob irradiação de ultrassom.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste tópico será dado enfoque aos principais temas relacionados ao processo de produção de enzimas, especificamente as lipases, iniciando com suas principais formas de produção utilizando fungos filamentosos, colocando em perspectiva as espécies do gênero *Penicillium* utilizadas no trabalho. Serão discutidos também as propriedades bioquímicas e cinéticas das lipases, além das reações de hidrólises e suas respectivas aplicações na indústria nacional.

3.1 Enzimas

No século XIX o alemão Wilheln F. Kühne criou o termo *enzym*, traduzindo para o português, enzimas, como proteínas dotadas de ação catalítica. A maioria das enzimas são proteínas, salvo por um pequeno grupo de moléculas de Ácidos Ribonucleicos (RNA) com função catalítica (BON et al., 2008). As enzimas possuem massas moleculares variando de cerca de 12000 a mais de um milhão de Daltons e algumas não necessitam de outros grupos químicos, além dos seus próprios resíduos de aminoácidos. Porém, existem enzimas dependentes de componentes químicos adicionais conhecidos como cofatores, podendo ser estes íons inorgânicos, moléculas orgânicas ou metalorgânicas complexas (coenzima) (HALDANE, 1930).

Christian Anfinsen e seu grupo mostraram em 1954 que a sequência de aminoácidos de uma proteína possui toda a informação necessária ao seu dobramento ou enovelamento em sua estrutura tridimensional nativa, funcional. Sua funcionalidade decorre de suas estruturas terciárias ou tridimensionais. Muitas proteínas apresentam estrutura quaternária, consistindo na associação de subunidades, isto é, na formação de oligômeros. Em alguns casos sítios de ligação resultam de dimerizações, sendo formadas por resíduos de aminoácidos pertencentes a duas subunidades diferentes (BON et al., 2008). Além disso, sabe-se que existem resíduos de aminoácidos envolvidos diretamente na mudança das ligações covalentes durante a ação das enzimas, como por exemplo, serina 195 e histidina 57, ambos encontrados em quimiotripsinas (KOSHLAND; NEET; 1968).

As enzimas são classificadas de acordo com as recomendações do Código Internacional estabelecido em 1961 pela IUBMB - International Union of Biochemistry and Molecular Biology (FABER, 2011). Assim sendo, cerca de 4000 enzimas estão catalogadas e cada uma delas catalisa uma reação específica, o que permite que sejam classificadas em seis grandes grupos: oxidorredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (Quadro 3.1).

Quadro 3.1 - Classificação internacional das enzimas

Classe de Enzima	Número		Tipo de reação	Utilidade*
	Classificadas	Disponíveis		
1. Oxidorredutases	700	100	Oxidação-redução: inserção de oxigênio nas ligações C-H, C-C, C=C, remoção ou adição total de átomos de hidrogênio ou hidreto (transferência de elétrons).	+++ 30%
2. Transferases	750	100	Transferência de grupos: aldeídico, cetônico, açúcar, acila, fosforila ou metila.	++ <5%
3. Hidrolases	680	180	Reações de hidrólise: ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, anidridos e glicosídeos.	+++ 65%
4. Liases	300	40	Adição-eliminação de moléculas pequenas nas ligações C=C, C=N e C=O.	++ 5%
5. Isomerases	150	6	Isomerizações semelhantes a racemização e epimerização na mesma molécula	± <1%
6. Ligases	80	5	Formação ou clivagem de ligações C-O, C-S, C-N e C-C com concomitante clivagem de trifosfato.	± <1%

Estimativa de utilização das classes de enzimas usadas na transformação de substratos não naturais variando entre +++ (muito utilizada) e ± (pouco utilizada).
* A maioria das enzimas catalisa a transferência de elétrons, átomos ou grupos funcionais. Assim, elas são classificadas, recebem nomes e números de código de acordo com a reação, o grupo doador e o grupo receptor.
(Fonte: FABER, 2011).

O uso de enzimas apresenta um conjunto de vantagens como alta seletividade, alta eficiência, alta velocidade de reação e atividade catalítica em ambos os sentidos da reação (SALIHU; ZAHANGIR, 2015). O mercado de biocatálise e produção de biocatalisadores, em termos de volume, está projetado para atingir 111.940 toneladas em 2019, indicando um mercado em franco crescimento (MARKETS AND BUSINESS, 2015).

Segundo a Novozymes, principal produtora mundial de enzimas, as principais aplicações industriais incluem: o setor alimentício, de bebidas, fármacos, bioenergia, agricultura e produtos de limpeza, para os quais foi constatado aumento na demanda em 2014, comparando com o mesmo período de 2013 (NOVOZYMES, 2014). A aplicação de enzimas, sinzimas (imitadores de enzimas) e abzimas (anticorpos com atividade catalítica) é ilustrada na Figura 3.1.

Figura 3.1- Emprego de enzimas, abzimas e sinzimas na indústria de biocatalisadores, terapia, síntese, análise e proteção ambiental

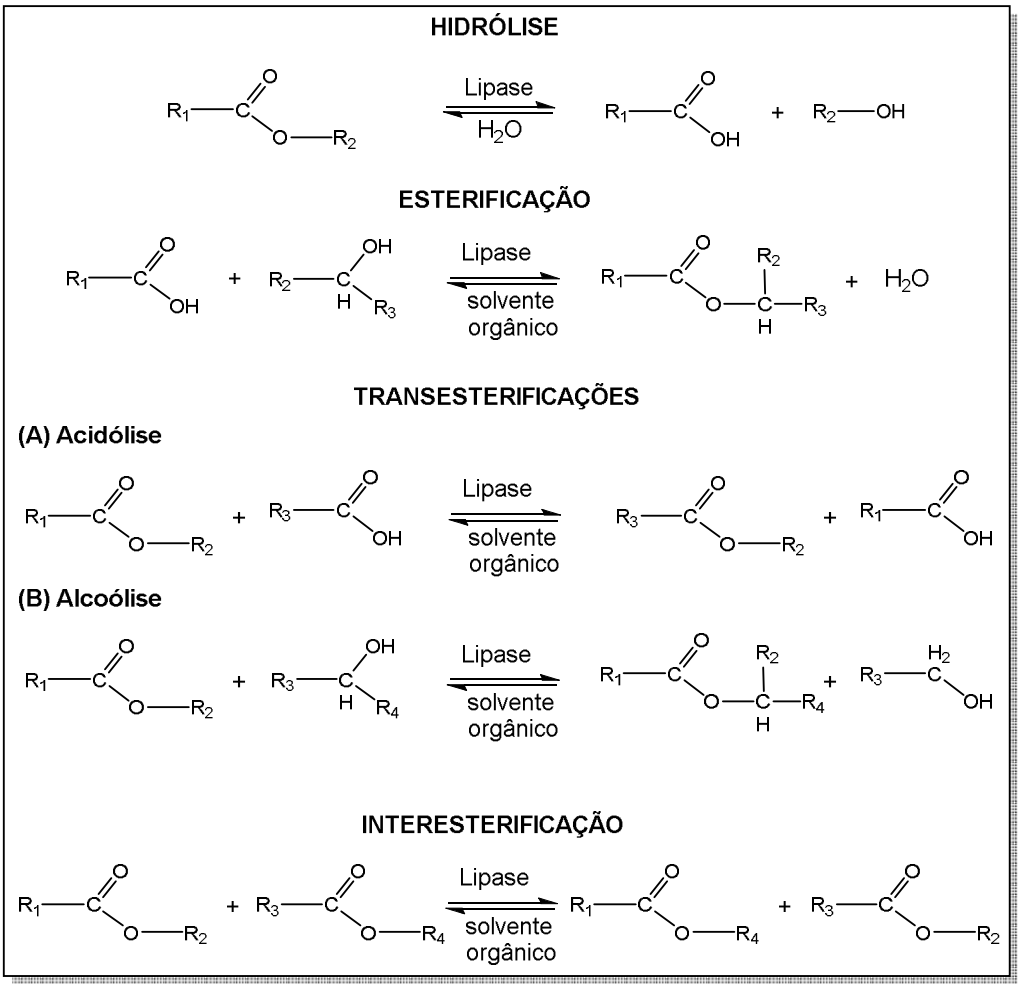
Fonte: adaptado (WISEMAN, 1995).

A frequência do uso de um tipo de enzima em biocatálise não é uniformemente distribuída entre suas diferentes classes. Esta distribuição segue um perfil definido por suas vantagens técnicas e versatilidade de aplicação. A participação das hidrolases (lipases, esterases e proteases) nas reações de biotransformação, perfaz um total de 75%. Este fato é uma consequência direta da disponibilidade comercial desses biocatalisadores, o que permite a seleção da enzima mais adequada para a biotransfomação desejada. Entre os processos químicos de maior interesse industrial, são destacadas as reações catalisadas pelas lipases (DE CASTRO et al., 2010).

3.2 Lipases

As lipases (glicerol éster hidrolases EC 3.1.1.3) pertencem a família das hidrolases e catalisam uma série de diferentes reações, como ilustrado na Figura 3.2. Além de clivar as ligações éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa, sob condições não aquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico (DE CASTRO et al., 2010). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa sequência lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes de partida empregados (HASAN et al., 2006). Lipases de diferentes fontes são capazes de catalisar a mesma reação, embora possam diferir no desempenho sob as mesmas condições reacionais (DE CASTRO et al., 2010).

Figura 3.2 - Reações típicas catalisadas por lipases



FONTE: Adaptado de (GHANEM, 2007).

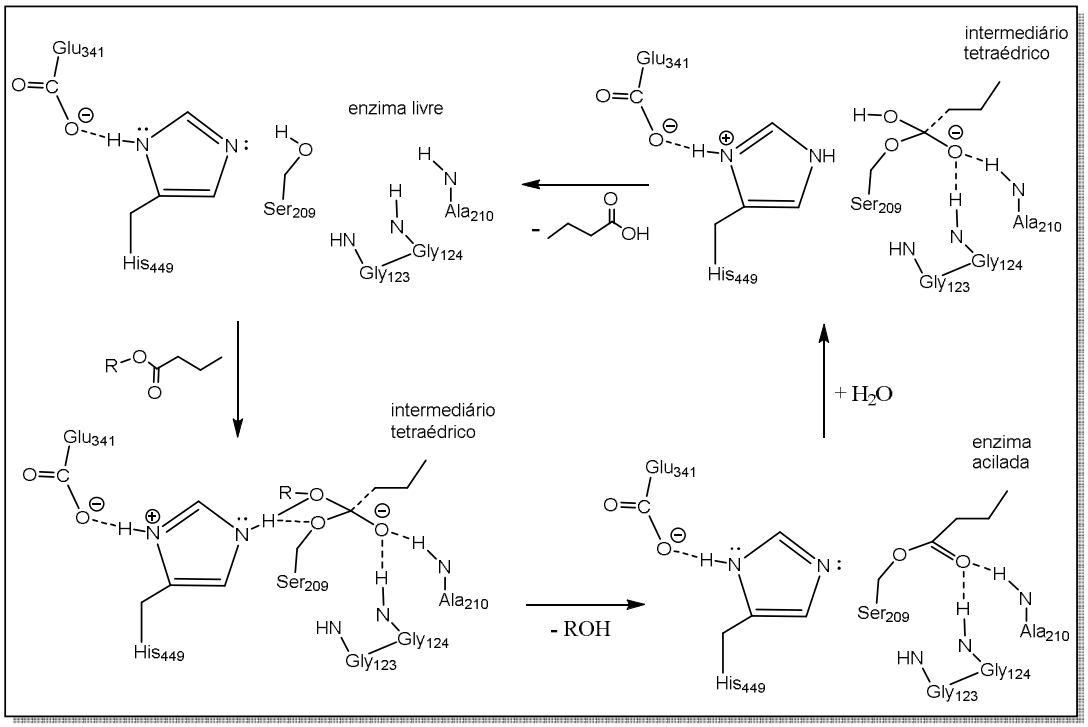
3.2.1 Mecanismo atuação das lipases

A atividade enzimática está estreitamente relacionada com a sua conformação. Na estrutura da lipase existe uma tampa de α hélice e uma tríade catalítica no sítio ativo, que geralmente consiste de três aminoácidos: Ser, His e Asp. Com relação a sua estrutura, lipases têm um enovelamento α/β hidrolase e as de maiores dimensões contém de 11 a 13 folhas beta e/ou alfa-hélices, com a maioria deles posuindo um segmento helicoidal chamado de "tampa" que cobre o sitio ativo quando a enzima está na sua conformação fechada. Na presença de agregados lipídicos, a tampa abre, e a atividade enzimática é aumentada, um fenômeno chamado de ativação interfacial. Apesar disso, lipases da espécie *Bacillus subtilis*, não apresentam este fenômeno e possuem um tamanho menor, sugerindo a ausência desta tampa (POUDEROYEN et al., 2001). Sabe-se que a tríade catalítica é conservada entre diferentes gêneros, tanto em *Rhizopus* quanto *Penicillium*, além dessa

região, a “tampa” também apresenta aminoácidos conservados (ISOBE; AUMANN; SCHIMID, 1994).

O mecanismo de hidrólise de um substrato lipolítico catalisada por uma lipase se inicia com a ligação do éster do lipídeo à enzima e o ataque do resíduo serina da biomolécula à carbonila do substrato, formando um intermediário tetraédrico (Figura 3.3). A quebra deste intermediário tetraédrico libera o álcool, permanecendo um intermediário correspondente à enzima acilada. Em uma reação de hidrólise a água ataca esta enzima acilada para formar um segundo intermediário tetraédrico. A quebra deste intermediário libera o ácido. Alternativamente, outro nucleófilo tal como um álcool pode atacar a enzima acilada, resultando, então, um novo éster (uma reação de transesterificação). Na maioria dos casos, a formação da enzima acilada é uma etapa rápida, portanto, a remoção do grupo acila a etapa determinante (KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998).

Figura 3.3 - Mecanismo catalítico de lipases baseado na “tríade catalítica” de *Candida rugosa*



Fonte: Adaptado (KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998).

3.3 Fontes de lipases

As lipases são enzimas ambíguas e podem ser de origem animal (pâncreas de bovinos, ovinos, suínos), vegetal (látex de mamão, soja, aveia e sementes de mamona) e microrganismos (bactérias, fungos e leveduras).

Dentre as lipases das diferentes origens, as provenientes de microrganismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, devido principalmente à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato, e facilidade de produção em larga escala. Além disso, possuem preço atrativo, a sua produção é simples, já que elas são em sua maioria extracelular, existe uma grande susceptibilidade a expressão em microrganismos hospedeiros, ampla faixa de pH e uma temperatura operacional ótima mais branda, tornando assim, um dos grupos de enzimas mais utilizados no segmento industrial (GUNCHEVA, 2011).

Fungos leveduriformes e filamentosos são as fontes mais importantes de lipases para aplicações industriais, entretanto muitas espécies de bactérias produzem lipases responsáveis por hidrolisar ésteres de glicerol em ácidos graxos preferencialmente de cadeia longa.

As lipases bacterianas, com poucas exceções, são capazes de hidrolisar completamente um substrato triacilglicerol embora tenha sido observada certa preferência por ligações de ésteres primários. A síntese e secreção de lipases pelas bactérias são influenciadas por uma variedade de fatores ambientais, tais como íons, fontes de carbono, ou presença de polissacarídeos não metabolizáveis (JAEGER et al., 1994). Além disso, bactérias são susceptíveis a modificações genéticas (mutagênese sítio dirigida, evolução dirigida), que permitem finas modificações nas propriedades intrínsecas das lipases. Embora exista um grande número de fontes de produção de lipases bacterianas, apenas algumas são exploradas comercialmente. Destas, as mais importantes são *Achromobacter, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Burkholderia, Pseudomonas e Chromobacterium.*

Entre estas, os gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia* possuem propriedades únicas, tais como elevada estabilidade térmica, enantio–seletividade e alta atividade em uma ampla faixa de pH, permitindo que ambos os grupos de bactérias atuem como catalisadores escolhidos pela maioria dos químicos orgânicos e farmacologistas (RAMANI et al., 2010).

Trabalhos utilizando as lipases fúngicas iniciaram-se em 1950 e uma revisão foi posteriormente apresentada por Lawrence et al., 1967 e subsequentemente por Brockerhoff

e Jensen, 1974 que discutiram vários aspectos dessas enzimas (FROST; MOSS, 1987). Desde então, muitos trabalhos vêm explorando a viabilidade de fungos para a produção de enzimas com propriedades atrativas como: estabilidade em pH alcalinos (CHINAGLIA et al., 2014) estabilidade térmica, especificidade pelo substrato e estabilidade em solventes orgânicos (LI et al., 2010).

As leveduras produtoras de lipase pertencem à classe dos ascomicetos, como *Candida* sp. entre outras (GUPTA et al., 2015). Uma grande quantidade de trabalhos na área de transesterificação utilizando lipases de leveduras como biocatalisadores é descrito na literatura (FEDOSOV et al., 2013; HUANG et al., 2010; AARTHY et al., 2014; KUMARI; GUPTA, 2012; TALUKDER et al., 2011). Entre as quais se destaca o gênero *Candida* com a espécie *C. antartica*, reportada como a preparação enzimática mais adequada para a transesterificação de óleos com alcoóis secundários para a produção de ésteres alquílicos de cadeia ramificada (AARTHY et al., 2014) e a espécie *Candida* sp. 99-125, que possui elevada atividade e capacidade de reuso, porém com custo mais baixo que outras lipases, possuindo grande potencial para aplicações industriais (GAO et al., 2013).

Espécies pertencentes a outros gêneros e muito utilizadas são as *Cryptococus* sp. e *Yarrowia lipolítica.* A primeira é muito eficiente na metanólise de óleos vegetais e formação de ésteres metílicos, além de mostrar alta estabilidade em elevadas proporções de solventes orgânicos (50%) (LOCK; CORBELINI; VALENTE, 2007). Lipase de *Yarrowia lipolítica*, por outro lado, é descrita na literatura como capaz de sintetizar ésteres de etila a partir do óleo de soja em duas etapas (hidroesterificação), ocorrendo a separação do glicerol (subproduto) ao fim da primeira etapa (hidrólise), impedindo sua atuação como inibidor enzimático na segunda etapa (transesterificação) (MENG et al., 2011).

Fungos filamentosos se diferenciam de leveduriformes pela presença de hifas. As hifas crescem na ponta e dividem-se repetidamente ao longo de todo o comprimento de seu corpo criando cadeias de ramificação que continuam crescendo e entrelaçando até formar uma rede de fios denominado micélio. Alguns dos ramos de hifas crescem no ar e esporos se formam nesses ramos aéreos. Os esporos são estruturas especializadas com uma camada protetora que os protege de condições ambientais adversas, tais como secagem e temperaturas elevadas (BLACKWELL et al., 2004).

Os fungos filamentosos saprófitas (ou decompositores) são comumente encontrados nos solos e entre os quais se destacam os gêneros *Saprolegniales, Pythiales, Mucorales, Eurotiales, Microascales, Hypocreales, Sordariales, Onygenales, Leotiales, Pezizales* e uma grande quantidade de fungos mitospóricos (são quase que exclusivamente

ascomicetos e basidiomicetos amorfos). Dentre os fungos filamentosos, os dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* são extremamente abundantes em solos úmidos de florestas tropicais, como, por exemplo, a floresta amazônica (BLACKWELL et al., 2004).

A produção de lipase por fungos filamentosos apresenta destaque, especialmente em se tratando daqueles pertencentes às várias espécies dos gêneros *Aspergillus* (ADINARAYANA et al., 2004; KARANAM; MEDICHERLA, 2008), *Rhizopus* (HIOL et al., 2000; SHUKLA; GUPTA, 2007), *Penicillium* (CHAHINIAN et al., 2000; LIMA et al., 2003; VARDANEGA et al., 2010) e *Trichoderma* (KASHMIRI et al., 2006; RAJESH et al., 2010). No âmbito comercial, os mais importantes são*: Rhizopus arrhizus, Rhizopus japonicus, Rhizopus niveus, Mucor miehei, Aspergillus niger* e *Aspergillus terrues*.

3.3.1 Lipases do gênero *Penicillium*

O gênero *Penicillium* é bem conhecido e ocorre numa grande variedade de *habitats*, desde a vegetação do solo até o ar, ambientes interiores e vários produtos alimentares. Ele tem uma distribuição mundial e grande impacto econômico sobre a vida humana. Sua principal função na natureza é a decomposição de materiais orgânicos, causando podridões devastadoras, como patógeno de pré e pós-colheita nas culturas alimentares (VISAGIE et al., 2014).

Penicillium (*Penicillium* sp.) pertence a ordem dos Eurotiales, a classe Eurotiomicetos e ao filo Ascomicota, sendo este, o mais abrangente filo do reino Fungi (BLACKWELL et al., 2004). Na natureza, são versáteis e oportunistas, em sua maioria saprófitos. Eles são patógenos de frutas colhidas, umas das causas mais comuns do desperdício de frutas e vegetais. Por outro lado, muitas espécies são úteis ao ser humano, tais como, o *P. roqueforti* e o *P. camemberti* utilizados desde a antiguidade para fabricação de queijos (LI; ZONG, 2010).

Os fungos do gênero *Penicillium* são bons produtores de enzimas como lipases, proteases, celulases e xilanases (LI; ZONG, 2010), porém, muitas das aplicações práticas desse tipo de lipases fúngicas são limitadas por desvantagens econômicas causadas por instabilidade dessas enzimas e procedimentos de purificação complexos.

No Quadro 3.2, são listadas as principais espécies produtoras de lipase do gênero *Penicillium*, dentre essas espécies, sete foram destacadas para a utilização neste trabalho e serão focadas nos tópicos seguintes. Além dessas, três espécies produtoras de hidrolases também serão abordadas nesse estudo, sendo elas *P. italicum, P. janthinellum* e *P. purpurogenum.*

Quadro 3.2 - Espécies do gênero *Penicillium* produtores de lipases

Gênero *Penicillium*	Referência	Gênero *Penicillium*	Referência
P. abeanum	Sugihara et al., 1996	*P. granulatum*	Yadav et al., 1998
P. aurantiogriseum	Chahinian et al., 2000	*P. griseofulvum*	Yadav et al., 1998
P. avellaneum	Yadav et al., 1998	*P. melinii*	Makhsumkhanov et al., 2003
P. brevicompactum	Yadav et al., 1998		
P. camemberti	Yamaguchi et al., 1992	*P. nelicum*	Yadav et al., 1998
P. caseicolum	Yadav et al., 1998	*P. nigricans*	Yadav et al., 1998
P. charlesii	Yadav et al., 1998	*P. oxalicum*	Yadav et al., 1998
P. chrysogenum	Bancerz et al., 2005	*P. restrictum*	Freire et al., 1997
P. citrinum	Yadav et al., 1998	*P. roqueforti*	Mase et al., 1995
P. corylophilum	Yadav et al., 1998	*P. rugulosum*	Yadav et al., 1998
P. corymbiferum	Yadav et al., 1998	*P. simplicissimum*	Gutarra et al., 2005
P. crustosum	Yadav et al., 1998	*P. spiculisporum*	Yadav et al., 1998
P. duclauxi	Yadav et al., 1998	*P. variable*	Yadav et al., 1998
P. egyptiacum	Yadav et al., 1998	*P. verrucosum*	Kempka et al., 2008
P. expansum	Yadav et al., 1998	*P. wortmanii*	Costa et al., 1999

Fonte: adaptada (LI; ZONG, 2010).

3.3.1.1 *Penicillium brevicompactum*

P. brevicompactum é conhecido por produzir colônias azuis a cinza esverdeada, muitas vezes enrugada com uma estreita margem branca; com algumas pálidas gotas acastanhadas (ONIONS et al., 1987). É normalmente encontrado no ar de interiores e conhecido na indústria como microrganismo contaminante durante o processo de produção de iogurte. Além disso, produz uma micotoxina denominada de ácido micofenólico (MPA), que atua como uma droga imunossupressora utilizada em pacientes recém-transplantados (NDAGIJIMANA et al., 2010). É interessante ressaltar que o ácido micofenólico não é um medicamento novo, tendo sido isolado em 1896 a partir de cultura de *P. brevicompactum* e purificado em 1913. Na década de 40 foi reconhecida sua atividade antibacteriana e antifúngica (NORONHA et al., 1997).

3.3.1.2 *Penicillium camemberti*

*P. camemberti p*roduz colônias levemente esverdeadas com uma cobertura branca. São essenciais no processo de maturação de queijos, como queijo Camembert e Brie justamente por apresentarem em seu metabolismo essas lipases (ONIONS et al., 1987).

As lipases dessa espécie são designadas como lipases mono e diacilglicerol (MDGLs), ou seja, hidrolisam mono e diacilglicerol, mas não o triacilglicerol. Por

possuírem especificidade por apenas esses substratos tornam-se altamente rentáveis para a síntese de monoacilgliceróis com elevado rendimento e hidrólise específica de diacilgliceróis em óleos que causam deterioração, diminuindo assim sua qualidade (YAMAGUCHI; MASE; TAKEUCHI, 1992).

A enzima lipase G Amano50 é produzida comercialmente por fermentação controlada de uma linhagem dessa espécie (*P. camemberti* U-150) (FOOD AND DRUGS ADMINISTRATIONS, 2001).

3.3.1.3 *Penicillium charlesii*

P. charlesii é conhecido por produzir citreoviridina, uma micotoxina responsável por inibir a ação da vitamina B1 no organismo, causando uma doença denominada Beribéri. Porém, *P. charlesii* é capaz produzir glicopeptídeos, contendo um antibiótico denominado etanolamina (UNKEFER et al., 1982). Ainda de acordo com a literatura este fungo é utilizado como fonte de proteases alcalinas. Em geral, as espécies de *Penicillium* e outros fungos tolerantes a ácidos produzem proteases ácidas, mas demonstram capacidade limitada para produzir proteases alcalinas e neutras. Em contraste, as espécies do gênero *Aspergillus* são conhecidas por produzir todos os três tipos de proteases (ABBAS et al., 1989).

3.3.1.4. *Penicillium citrinum*

P. citrinum é uma espécie normalmente encontrada em solo e resíduos e é bem documentado como produtor de citrina e outros metabólitos. Seu crescimento é restrito, denso, com uma fina margem aveludada e rugas radiais. De cor verde para verde-acinzentado fosco (ONIONS et al., 1987).

De longa data era conhecida como a única espécie produtora da Micotoxina Nefrotóxica Citrina, porém, estudos posteriores demonstraram que *P. corylophilum*e e *P. stecki* também a produzem (MALMSTROM et al*.,* 2000).

Pimentel et al. (1994) sugerem que em determinadas condições, esta espécie produz lipases extracelulares, instáveis termicamente (60 ºC) possuindo aplicação industrial na área de limpeza (detergentes) e de outros produtos que requerem elevada estabilidade à temperatura ambiente.

3.3.1.5 *Penicillium chrysogenum*

P. chrysogenum é um fungo de ocorrência comum em ambientes internos, como poeira, ar interior, e materiais de construção com alta umidade. Além disso, é frequentemente identificado como um agente de deterioração dos alimentos e ganhou muita atenção por sua utilização na produção do antibiótico penicilina (HOUBRAKEN et al., 2011).

O isolamento de novas cepas de *P. chrysogenum,* durante os programas de melhoramento industrial na década de 40, e modificações nos meios de cultivo favoreceram o desenvolvimento de microrganismos altamente produtores de penicilina. O esforço cooperativo entre universidades e laboratórios industriais na Inglaterra e nos Estados Unidos nos anos de 1942 e 1943 levou a múltiplos ensaios clínicos em grande escala para tratar os feridos no campo de batalha durante a Segunda Guerra Mundial. Um ano após o fim da guerra, a venda de penicilina foi aberta ao público geral (BARREIRO et al., 2012).

Alguns estudos relacionados a lipases produzidas a partir de *P. chrysogenum* vêm sendo relatados nos quais a presença de atividade de lipase nas culturas foi detectada, especialmente quando induzida por óleos ou ácidos graxos. Estas lipases mostraram especificidade para ácidos graxos de cadeia curta, como por exemplo, ácido butírico (FERRER et al., 2000).

3.3.1.6 *Penicillium italicum*

A deterioração dos alimentos por fungos resulta em perdas econômicas que variam de 5 a 20% da produção em países desenvolvidos e podendo chegar a 50% em regiões com um clima tropical (PIMENTA et al., 2008). *P. italicum e P. digitatum* (fungos verdes e azuis) são os causadores das doenças mais prejudiciais em frutas cítricas após a colheita (TAO et al., 2014).

Apesar dessas características negativas, foi demonstrado na literatura que essa espécie produz algumas enzimas utilizadas em escala industrial. Uma delas é a pectina liase (PNL, EC 4.2.2.10), que provavelmente é a única enzima capaz de quebrar a pectina com elevado grau de esterificação (como aqueles encontrados em frutos) em moléculas menores, inclusive pode ser utilizada em sua forma imobilizada (AKORTA et al., 1996). Esta enzima atua sobre as substâncias pécticas que ocorrem na natureza como polissacarídeos estruturais da lamela média e paredes celulares primárias das plantas

superiores. Além disto, possui aplicações potenciais na indústria têxtil, de alimentos e de papel (YADAV et al., 2009).

3.3.1.7 *Penicillium janthinellum*

P. janthinellum faz parte de um grupo muito variável com cobertura ampla, com colônias espalhadas, apresentando ranhuras radiais, de cor verde acinzentado com variações em cores amarelo esverdeado, as vezes com pigmentos vermelhos (ONIONS et al., 1987).

O interesse na utilização da biomassa fúngica para hidrólise enzimática de celulose visando produzir açúcares chamou a atenção e a identificação das condições que favorecem a liberação extracelular rápida de enzimas celulolíticas. Nesse contexto essa espécie é conhecida na literatura como um produtor eficiente de celulases, tanto a estirpe selvagem quanto a mutante (ADSUL et al., 2009).

3.3.1.8 *Penicillium oxalicum*

Essa espécie possui colônias que crescem espalhadas, de coloração verde fosco, com uma massa densa e aveludada de conídios que se quebram em crostas quando a cultura é agitada e da respectiva cultura um aspecto sedoso a baixas ampliações microscópicas (ONIONS et al., 1987).

Yadavet al., 1996 demonstraram que o *P. oxalicum* possuía atividade lipolítica extracelular, mesmo que em pequenas quantidades. Além disto, este fungo também produz grande quantidade de enzimas xilanolíticas acidófilas, além de enzimas celulolíticas (LIAO et al., 2015). Considerado também um produtor em potencial da enzima renina, sendo esta, responsável pela ativação do sistema renina-angiotensina (coagulação sanguínea), além de atuar também na coagulação do leite para produção de diversos produtos industriais (HASHEM, 2000).

3.3.1.9 *Penicillium roqueforti*

P. roqueforti possui colônias amplamente espalhadas, azul escuro a verde escuro, liso e aveludado. Encontrado em lugares de armazenamento de frutas e alimentos (ONIONS et al., 1987).

Essa espécie é conhecida por desempenhar um papel fundamental no processo de maturação de queijos. Para a fabricação do queijo, o controle do crescimento fúngico e

maturação das culturas são fundamentais, assegurando que os queijos são rapidamente colonizados, evitando assim, a proliferação de contaminantes (LE DRÉAN et al., 2010).

O sistema lipolítico de *P. roqueforti* tem sido extensivamente pesquisado. Estudos demonstraram que essa espécie pode sintetizar lipase quando cultivada em meio isento de óleo como fonte de carbono. Além disto, pode produzir no mínimo dois tipos de isoenzimas de lipase extracelulares, as quais apresentaram valores diferentes com relação ao pH ótimo de atividade sob condições ácida e alcalina (EITENMILLER et al., 1970; LAMBERET; MENASSA, 1983). Hamlym et al., 1987 isolaram a partir de uma linhagem de *P. roqueforti* três tipos de lipases com diferentes massas moleculares que apresentam especificidades diferentes quanto ao substrato.

3.3.1.10 *Penicillium purpurogenum*

P. purpurogenum apresenta usualmente colônias aveludadas, muitos esporos, de cor verde escura, com micélio amarelo (ONIONS et al., 1987). Este fungo é descrito na literatura como um bom produtor de β-glicosidase, uma importante enzima do complexo celulolítico microbiano, sendo responsável pela conversão da celobiose em glicose (HIDALGO; STEINER; EYZAGUIRRE, 1992). Dentre várias aplicações, recentemente esta espécie vem crescendo em importância no campo de produção de alimentos funcionais porque atua transformando isoflavonas glicosiladas da soja em isoflavonas agliconas, aumentando a biodisponibilidade destas biomoléculas ao intestino humano. Esta enzima também é utilizada para a estabilização da cor de sucos e bebidas, hidrolisando antocianinas em antocianidinas, que são facilmente removidas durante a filtração (LEITE, 2007).

O fungo filamentoso *P. purpurogenum* também tem demonstrado ser bom produtor tanto de endoxilanases por expressão heteróloga em *Sacharomyces cerevisiae* quanto de diversas xilanases extracelulares em cepas selvagens (CHÁVEZ et al., 2002). Estas enzimas estão encontrando cada vez mais aplicações na área da biotecnologia, em particular no branqueamento da polpa de celulose (BELANCIC et al., 1995).

3.4 Produção de lipases

3.4.1 Lipases extracelulares

Aunstrup em 1979 elaborou um artigo de revisão sobre produção de lipase extracelular, mas com pouca atenção aos meios de cultura. Muitas das lipases microbianas

são extracelulares e são excretadas pelo organismo através de membrana celular para o meio de cultura.

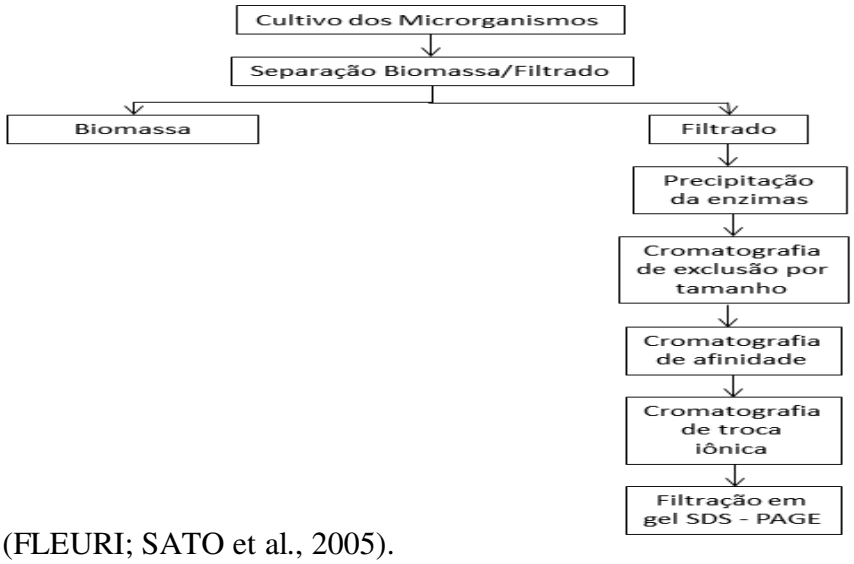
A maioria das enzimas extracelulares industriais importantes são hidrolases atuando em substratos de alta massa molecular. Para o microrganismo elas geralmente possuem função fisiológica e produzem nutrientes provenientes de polímeros biológicos que estão disponíveis no meio celular (FROST; MOSS; 1987).

Pelo fato da produção de enzimas extracelulares utilizarem uma alta proporção dos recursos disponíveis na célula, a biossíntese e secreção de cada enzima estão sujeitas a um mecanismo regulatório relativamente complexo. Geralmente, essas enzimas são induzidas por baixos níveis de produtos de hidrólise de polímeros e às vezes, o próprio polímero atua como um bom indutor (FROST; MOSS; 1987).

A regulação por glicose da produção de enzimas extracelulares tem sido muito estudada e é bem conhecido o efeito repressor deste açúcar na produção de várias enzimas como lipases, celulases, amilases e invertases (BON et al., 2008). Por outro lado, a produção de lipases geralmente é estimulada por lipídeos e normalmente coordenada pela viabilidade de ácidos graxos. Alguns indutores tem um efeito marcante na estimulação da produção. Os indutores incluem: triacilgliceróis, ácidos graxos, ésteres hidrolisáveis, sais biliares e glicerol (GHOSH et al., 1996).

A etapa downstream incluindo separação e purificação da lipase é complexa e trabalhosa, como ilustrado na Figura 3.4, envolvendo técnicas mais simples como precipitação e diálise até a utilização de técnicas como gel filtração e cromatografia de troca iônica (LABOUREUR et al., 1966).

Figura 3.4 - Fluxograma genérico do processo de produção enzimática extracelular



az

Fonte: adaptado (FLEURI; SATO et al., 2005).

Apesar do esforço direcionado em pesquisa para simplificação dessas técnicas, esta etapa ainda apresenta custo elevado e, portanto, a adoção de lipases ligadas ao micélio, pode ser uma alternativa promissora, principalmente na obtenção de commodities.

3.4.2 Lipase ligada ao micélio

A produção de enzimas microbianas ligadas ao micélio já é estudada desde 1979. O termo é aplicável a todas as enzimas remanescentes nas células após os processos de separação das células do meio de cultura. Algumas das enzimas estão provavelmente localizadas no periplasma, exceto para fungos filamentosos. Em outros casos, uma pequena proporção da atividade total pode ser encontrada no sobrenadante, isto ocorre, pela lise ou rompimento de células menores (FROST; MOSS, 1987).

O Quadro 3.3 lista as principais vantagens e desvantagens em relação a obtenção de enzimas ligadas ao micélio e extracelular.

O uso de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos vem despertando interesse pelo seu potencial em biocatálise e recentemente, a literatura aponta um crescimento nos artigos publicados sobre a produção de lipases ligadas ao micélio com elevada atividade lipolítica e sua aplicação em reações típicas da lipase. Diversos trabalhos descrevem, por exemplo, o uso de lipase ligada ao micélio a partir dos fungos dos gêneros *Rhizopus e Aspergillus* (FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009; XIAO; MATHEW; OBBARD, 2010; YOSHIDA et al., 2012) para a produção de biodiesel e de *Mucor,* particularmente *M. circinelloides* como biocatalisador em reações em meio orgânico, incluindo ésteres aromáticos, ésteres de açúcar e ésteres de etila a partir de óleos de baixo custo (ANTCZAK et al.; 2002; 2004; GARCIA – GALAN et al., 2013; ANDRADE et al., 2012, 2014).

Quadro 3.3 - Vantagens e desvantagens dos diferentes processos de produção de lipases.

Processo de produção	Vantagens	Desvantagens	Referência
Lipase ligada ao micélio	Não necessita das etapas complexas separação e purificação.	Ainda são poucas as espécies estudadas e por isso, pouco utilizadas industrialmente.	BHARATHIRAJA et al., 2014
	Fungos filamentosos são considerados catalisadores resistentes na forma de células íntegras.	Quando imobilizadas apresentam limitações com relação ao transporte de massa e acesso ao substrato.	XU et al., 2002
	Podem ser imobilizadas *in situ* ou *extra situ,* tornando possível a utilização de diferentes de técnicas de imobilização em matrizes diversas.	Algumas das enzimas envolvidas estão localizadas provavelmente em locais de difícil acesso ao substrato, como o periplasma em bactéria e leveduras, causando menor atividade lipolítica.	FROST; MOSS; 1987
Lipase extracelular	São as mais utilizadas no mercado de produção de enzimas.	Alto custo devido aos processos de purificação e separação complexos.	LABOUREUR et al., 1966
	Não são necessários cuidados especiais com relação a integridade celular.	Enzimas extracelulares utilizam elevada proporção dos recursos disponíveis na célula, para a secreção de lipases e estão sujeitas a um mecanismo regulatório complexo.	FROST; MOSS, 1987
	Lipases solúveis	Essas enzimas quando estão "livres", podem ser utilizadas apenas uma vez, devido à dificuldade de recuperação e o fato de ser facilmente desnaturada.	XU et al., 2002

3.4.3 Fatores que influenciam a produção de lipases

Para estudar o crescimento microbiológico e a formação de produtos de seu metabolismo, tanto metabólitos primários quanto secundários, é essencial entender a relação entre a regulação do metabolismo microbiano e o ambiente no qual a célula está

exposta. O microrganismo se adapta ao ambiente respondendo com mecanismos tanto de natureza física como química.

Lipases microbianas são principalmente extracelulares e sua produção é muito influenciada pela composição do meio. As lipases são enzimas induzíveis e o principal fator para a expressão da atividade da enzima foi relatado como sendo a fonte de carbono. (DOBREV et al., 2015). Sua produção é normalmente estimulada por lipídeos e geralmente coordenada com a presença de triacilgliceróis, certos indutores tem um efeito expressivo na estimulação de produção de lipases, como demonstrado no Quadro 3.4 (GHOSH et al., 1996).

Quadro 3.4-Efeito de diferentes indutores na produção de lipases em vários microrganismos.

Fonte de Lipídeos	Organismo	Efeito indutor
Lipídeos	*Aspergillus wentii*	Decaimento na expressão
Óleo de oliva	*Mucor caseyoliticus*	Decaimento na expressão
Óleo de oliva, milho e manteiga	*P. roqueforti*	Decaimento na expressão
Tributirina e trioctanoina	*P. fragi* *M. freudenreichii*	Sem efeito na expressão
Ácidos graxos insaturados	*P. fragi*	Decaimento na expressão
Ácidos oléicos, linoleicos e linolênicos	*P. menfítica*	Aumento na expressão

Fonte: GHOSH et al. 1996.

3.5 Propriedades bioquímicas e cinéticas das lipases

A maioria das lipases apresenta uma faixa ótima de atividade e estabilidade entre pH 6,0 e 8,0 e temperatura ótima para atividade entre 40 e 60 °C. Lipases de *Penicillium* foram caracterizados extensivamente e suas propriedades bioquímicas gerais incluindo massa molecular, valores otimizados de pH, temperatura e estabilidade térmica são resumidas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Propriedades bioquímicas das lipases de diferentes espécies do gênero *Penicillium*

Propriedades	**Fontes de Lipase**				
	***P. expansum* PED-03**	***P. solitum* 194 A**	***P. roqueforti* IAM 7268**	***P. chrysogenum***	***P. camembertii* Thom PG-3**
Massa Molecular (kDa)	28	42	25	40	28
Especificidade posição/cadeia	Não específica	TAGs de cadeia média	-	TAGs de cadeia curta	TAGs de cadeia média
Temperatura ótima (ºC)	35	-	35	45	48
pH ótimo	9,0	9-9,5	6,0-7,0	7,9-8,1	8,0
Termoestabilidade (ºC) (tempo de meia-vida)	-	45 (10 min)	Estável a 30	Estável a 25	35 (10 min)

Fonte: Adaptado de Li et al., (2010), Chinaglia et al., (2014).

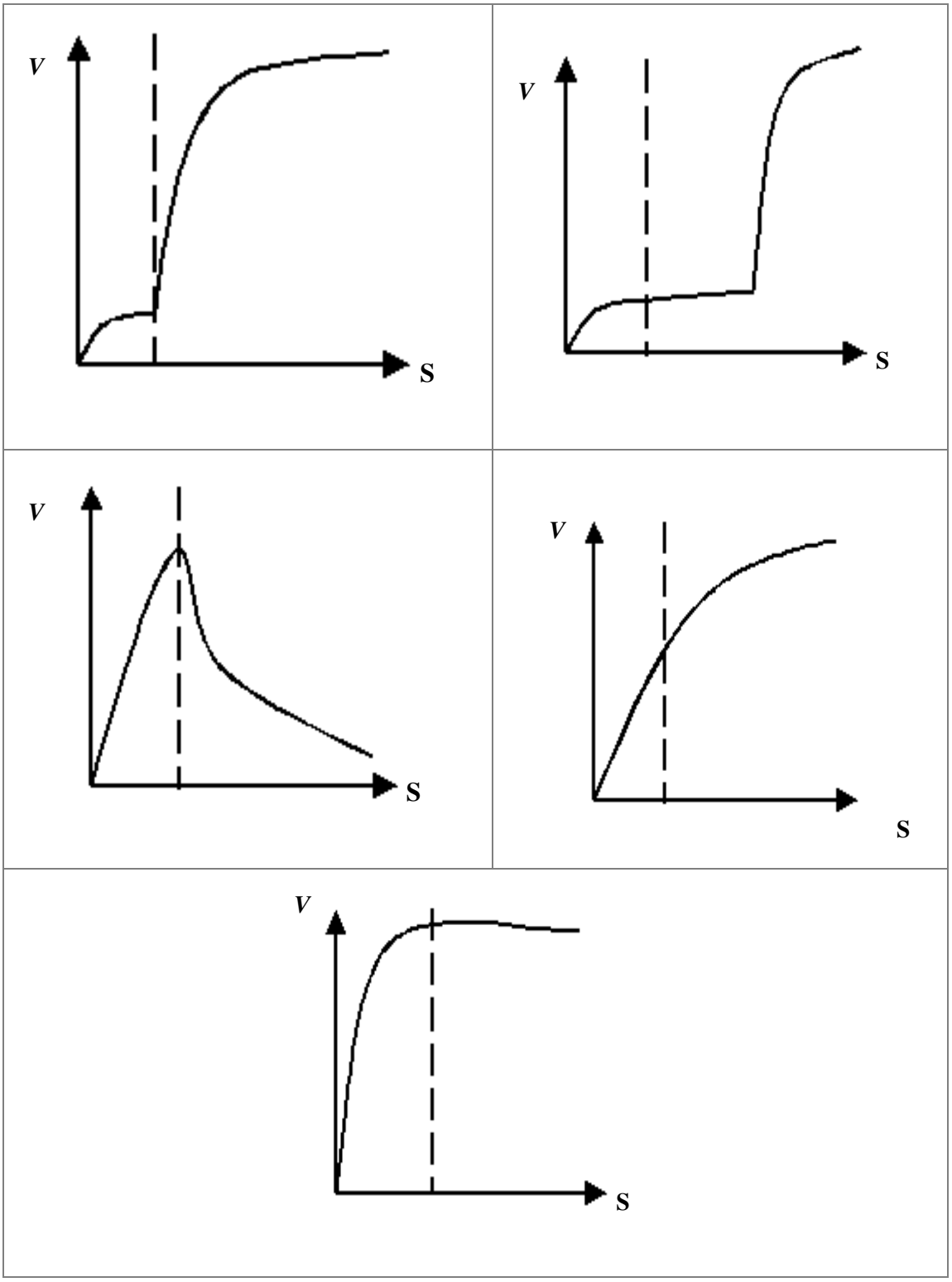
Estas propriedades, entretanto, podem variar significativamente, dependendo da origem, ou mesmo entre isoformas produzidas por um mesmo microrganismo. Estas variações também dependem do método e do substrato utilizados e das condições do ensaio, como pH e temperatura, tornando difícil a comparação apenas com os dados disponíveis na literatura ou fornecidos pelos fabricantes.

Vários mecanismos têm sido propostos para reações de hidrólise catalisadas por lipases. O modelo cinético mais simples é baseado no clássico mecanismo de Michaelis-Menten aplicado a sistemas emulsificados óleo/ água (GAN et al., 2000; MALCATA et al., 1990). Entretanto, resultados de pesquisas recentes sobre lipases, têm mostrado que é necessário ter prudência na extrapolação de algumas características cinéticas e estruturais observadas para todas as lipases em geral. As atividades catalíticas de muitas enzimas lipolíticas medida na hidrólise de ésteres carboxílicos, os quais são parcialmente solúveis em água, apresentam diferentes perfis cinéticos, conforme pode ser observado na Figura 3.5 (FREITAS et al., 2006).

Um fator característico de lipases é sua ativação interfacial. É demonstrado que a atividade das lipases aumenta quando a concentração do substrato atinge o limite de solubilidade e formam uma segunda fase. Isto indica uma diferença fundamental entre esterases e lipases. As esterases seguem a cinética normal do tipo Michaellis-Menten com substratos soluveis e não têm atividade relacionada a ésteres insolúveis. Lipases, entretanto, tem maior atividade em substratos insolúveis, mas muitas vezes têm a cinética do tipo Michaeliana negligenciada com relação a substratos solúveis (MARTINELLE; HULT, 1994).

A catálise enzimática baseada no estudo clássico de Michaelis-Menten é entendida como a análise quantitativa do efeito de cada um dos fatores que influenciam a atividade enzimática, e avaliada por meio do aumento ou redução da velocidade da reação catalisada. A atividade da enzima, portanto, a cinética enzimática, é determinada pela concentração da enzima, concentração de substrato e sua disponibilidade, concentração de cofatores, concentração e tipo de inibidores (quando presentes), e ainda pH e temperatura.

Figura 3.5 - Velocidade de reação de hidrólise (V) em função da concentração do substrato (S) parcialmente solúvel em água. Linhas verticais representam a solubilidade máxima ou concentração miscelar crítica do substrato (éster) usado.



Fonte: Adaptado (FREITAS et al., 2006).

A Equação 3.1 de Michaelis-Menten propõe o modelo acima citado, como modelo de reação enzimática para apenas um substrato. A partir deste modelo, foi deduzida uma equação, que permite demonstrar como a velocidade de uma reação varia com a concentração do substrato (FREITAS et al., 2006).

$$Vo = \frac{\text{Vmax [S]}}{\text{Km+[S]}} \tag{3.1}$$

Em que: Vo = Velocidade inicial, Km = constante de Michaelis-Menten; Vmax = velocidade máxima da reação; [S] = substrato

Baseando-se nesta equação pode-se expressar graficamente, e representar o efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de reação enzimática. O Km de um substrato para uma enzima específica é característico, e fornece um parâmetro de especificidade deste substrato em relação à enzima. Quanto menor o Km, maior a especificidade, e vice-versa (FREITAS et al., 2006).

3.6 Aplicações de lipases

Cada vez mais são desenvolvidas estratégias promissoras para alcançar produtos mais puros, além de diminuir a poluição causada por rejeitos industriais. A utilização de enzimas exibe um elevado número de fatores propícios para tornar estes objetivos uma realidade vantajosa em relação a catálise convencional. Mesmo com alta eficiência catalítica, as lipases funcionam geralmente em condições moderadas de temperatura, pressão e pH, atingindo velocidades de reação de mesma ordem das conseguida por catalisadores químicos nas condições mais extremas. Lipase, como candidatos potenciais para reações "ambientalmente corretas", podem ser aplicadas em diferentes rotas de síntese, como transesterificação e esterificação, além de reações de hidrólise (LIU et al., 2013).

Lipases são consideradas como umas das mais importantes classes de enzimas industriais e devido a sua versatilidade, vem ganhando espaço no mercado de enzimas. As aplicações propostas para fins industriais utilizando lipases excedem de longe, outras hidrolases como proteases e carboidrases (BON et al., 2008). Essa versatilidade reacional e sua adaptabilidade em diferentes solventes tem resultado no seu uso difundido em diversos segmentos industriais, como setor alimentício (desenvolvimento de aromas, maturação de

queijos, lipídeos estruturados e emulsificantes) (KURTOVIC et al., 2016), farmacológico (síntese de antitumorais, anticarcinogênicos e intermediários de drogas) (JO; KIM, 2016), oleoquímico (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biosurfatantes) (PURWANTO et al., 2015), formulação de detergentes, meio ambiente (redução do teor de lipídeos de águas residuárias) (MOBARAK-QAMSARI et al., 2012) e na geração de energia (biodiesel) (DE CASTRO et al., 2010; BON et al., 2008).

3.6.1 Aplicações de lipases em reações de hidrólise

Existem inúmeras aplicações de lipases na indústria oleoquímica, dentre as quais se destacam a produção de concentrados de ácidos graxos a partir de óleos vegetais e tratamento de efluentes contendo elevados teores de lipídeos.

Óleos vegetais, de maneira geral, têm sido alvo de constantes pesquisas e melhoramentos a fim de se obter uma maior quantidade de ácidos graxos insaturados devido principalmente ao efeito que possuem sobre a saúde humana. Ácidos graxos estão presentes nas mais diversas formas de vida, desempenhando importantes funções na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos. Em humanos, os ácidos linoleico (18:2 n-6) e alfa-linolênico (18:3 n-3) são necessários para manter sob condições normais, as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Várias pesquisas vêm demonstrando a importância de ácidos graxos insaturados na prevenção de doenças cardíacas (GLÜCK; ALTER, 2016), neurológicas (SONG et al., 2015), atuando até em processos inflamatórios (CALDER, 2010) e doenças envolvendo articulações (HURST et al., 2010).

No Quadro 3.5 estão sumarizadas pesquisas efetuadas que demonstram o grande interesse na obtenção dos ácidos graxos saturados e poli-insaturados a partir de óleos e gorduras. No entanto, a quantidade de trabalhos envolvendo a hidrólise de óleos vegetais empregando biocatalisadores de células íntegras é ainda escassa, demonstrando ser um campo inexplorado e com grande potencial a ser desenvolvido.

O processo de hidrólise enzimática utilizando células íntegras de fungos é de menor custo em relação ao processo enzimático utilizando a enzima purificada, viabilizando assim sua utilização em larga escala. Os ácidos graxos livres, como por exemplo, ômega-3, podem ser obtidos por hidrólise microbiana de triacilgliceróis. Os monoacilgliceróis saturados ou insaturados obtidos são os agentes tensoativos mais utilizados na indústria alimentar. Eles são amplamente utilizados também na preparação de cosméticos e produtos farmacêuticos, fabricação de resinas alquílicas e detergentes (PURWANTO et al., 2015).

Quadro 3.5 - Exemplos de processos de hidrólise enzimática de lipídeos

Fonte lipídica	Lipase	Condições reacionais	Objetivo	Referências
Óleo de coco	*Mucor miehei*	Proporção óleo/água 1:2,5 45 ºC, 300 rpm	Produção de ácidos graxos de cadeia média (Indústria alimentícia e suplementos)	CHUA et al., 2012
Óleo de palma	Lipase-SP398	Proporção óleo/água 1:16, 40 ºC, pH=7 1000 rpm	Ácidos graxos saturados (Indústria de lubrificantes)	NOOR et al., 2003
Óleo de macaúba	Lipase vegetal (mamona)	Proporção óleo/água 1:1, 30 ºC, pH=4	Hidroesterificação (Biodiesel)	AGUIEIRAS et al., 2014
Óleo de canola	*Rhizopus miehei* Lipase vegetal (mamona)	Proporção óleo/água 1:3, 40 ºC, pH=8,2 Proporção óleo/água 1:9, 25 ºC, pH=4,5 1000 rpm	Produção de ácido oleico (Indústria alimentícia e suplementos)	CAVALHEIRO, 2013 AVELAR et al. 2013
Óleo de soja	*Rhizopus oryzae*	Proporção óleo/água 1:4, 30-40 ºC, pH=6,5	Produção de diacilglicerol (Indústria alimentícia e suplementos)	LI et al., 2015
	Enzima vegetal (mamona)	Proporção óleo/água 1:9, 25 ºC, 1000 rpm		AVELAR et al., 2013
	Lipozyme TL IM	Proporção óleo/água 1:9, 65 ºC, 600rpm Acoplado ultrassom		FEITEN et al., 2014
Óleo de oliva	Lipase vegetal (mamona)	Proporção óleo/água 1:9, 25 ºC, pH=4,5 1000 rpm	Produção de ácido oleico (Indústria alimentícia e suplementos)	AVELAR et al., 2013
Óleo de cozinha usado	*Candida rugosa*	Proporção óleo/água 1:4, 30 ºC, 250 rpm	Produção de biolubrificante	AVISHA; DEBARATI; DIPA, 2012
Óleo de mamona	*Rhizopus oryzae*	Proporção óleo/água 1:4, 37 ºC, pH=7,0, 120 rpm	Produção de mono e diacilglicerol (Indústria Cosmética)	KHASKHELI et al., 2015
Óleo de colza	Fosfolipase A1	Proporção óleo/água 1:4, 50 ºC, pH=5,0, 500 rpm	Degomagem de óleos	JIANG et al., 2014

Outra área de aplicação de lipases se concentra no tratamento de efluentes industriais. O rápido crescimento das indústrias não somente aumentou a produtividade, mas também, resultou na liberação de substâncias tóxicas para o ambiente, criando riscos para a saúde. Isto tem afetado seriamente as operações naturais de ecossistemas, flora e fauna. Nos últimos anos, tem se dado grande atenção aos resíduos industriais, que geralmente são descarregados em terra ou em diferentes corpos de água. A indústria de laticínios, em média, gera entre 6 a 10 litros de águas residuais por litro de leite processado.

Pelo fato da água exercer papel fundamental na indústria de laticínios, o que resulta na geração de volumes significativos de efluentes, existe a necessidade de efetuar sua recuperação e esse desafio não pode ser ignorado. Com base nessas informações, podem ser adotados métodos físicos, químicos ou biológicos no tratamento de efluentes (PORWAL; MANE; VELHAL, 2015). Com relação ao tratamento biológico, os microrganismos podem ser naturais de uma área contaminada ou podem ser isolados a partir de outras regiões e trazidos para o local contaminado. Além disto, para o desenvolvimento de um tratamento biológico eficiente de águas residuais, é muito importante conhecer a composição da microbiota do mesmo, as propriedades bioquímicas correlacionadas a origem dos poluentes, bem como condições ótimas de atividade metabólica e características físico-químicas (PORWAL; MANE; VELHAL, 2015).

Mobarak-Qamsari et al. (2012) demonstraram a eficiencia da utilização de um extrato enzimático na etapa de pré-hidrólise de efluentes ricos em gorduras derivado da indústria de laticínios como pré-tratamento para a digestão anaeróbica. Ainda com relação à etapa de pré-hidrólise Adulkar e Rathod (2014) utilizaram Lipase Z, uma enzima conhecida por apresentar especificidade as ligações éster de triacilgliceróis aumentando a taxa de hidrólise, associada ao equipamento de ultrassom, para o tratamento de efluentes ricos em gorduras. Em outro estudo, Porwal, Mane e Velhal (2015) utilizaram diferentes isolados microbianos provenientes de lodo ativado na biorremediação de efluentes de laticínios, demonstrando assim a eficiência do processo biológico na purificação deste rejeitos.

Outra aplicação de grande impacto socioeconômico das reações de hidrólise é a sua utilização em reações de hidroesterificação para a produção de biodiesel.

A demanda por energia está aumentando a cada dia. Atualmente, a maior parte da energia é obtida a partir de combustíveis fósseis, responsáveis pela liberação de hidrocarbonetos tóxicos como um produto da combustão, aumentando a poluição

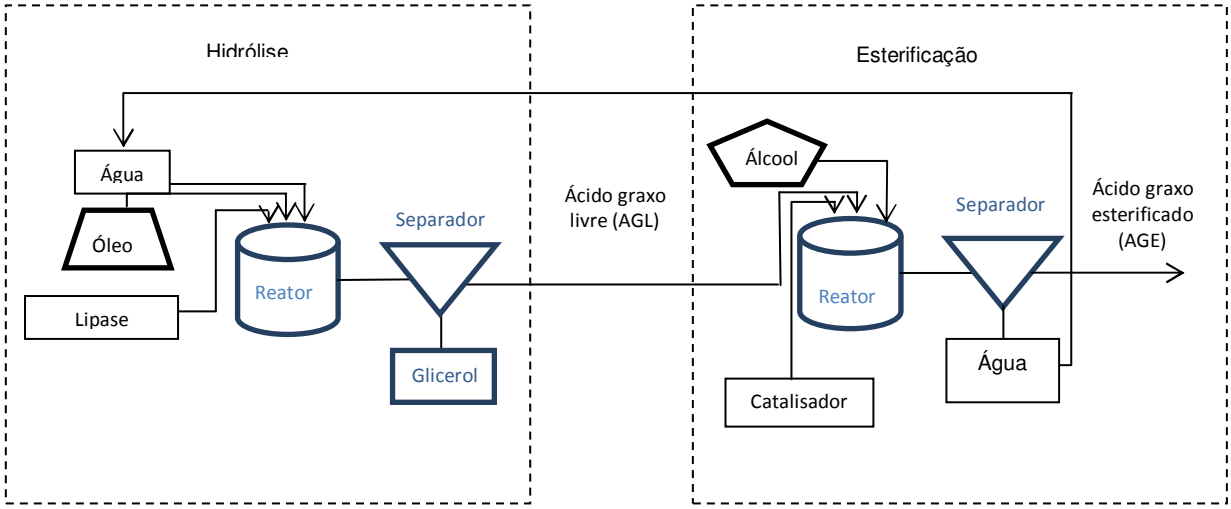
atmosférica e o efeito estufa, o que leva a um efeito adverso sobre o meio ambiente. A única solução para reduzir o uso de combustíveis fósseis é aumentar o uso de energia renovável. Dentre uma vasta gama de fontes de energia renováveis, o biodiesel é considerado promissor (RAMKUMAR; KIRUBAKARAN, 2016).

Hidroesterificação é um processo integrado combinando dois processos industriais, hidrólise e esterificação em reações sucessivas para gerar biodiesel. Este processo pode ocorrer por hidroesterificação livre de catalisador (hidrólise e esterificação em condições sub/supercríticas), hidroesterificação química/ enzimática e hidroesterificação enzimática. Esta técnica foi recentemente estabelecida como um meio para resolver os problemas relacionados com a produção de biodiesel pelo método convencional, utilizando matérias-primas de segunda geração contendo altas porcentagens de ácidos graxos livres e água, tais como, gorduras animais, óleos não comestíveis e óleos residuais. Algumas desvantagens do processo convencional incluem taxas de reação lentas, formação de sabão, dificuldades na purificação do catalisador, contaminação do glicerol (subproduto de valor agregado) com metanol e produção de sal pela neutralização do catalisador empregado (POURZOLFAGHAR; ABNISA; AROUA, 2016).

A rota enzimática do processo vem ganhando muita atenção de pesquisadores da área (AGUIEIRAS et al., 2014, DE SOUSA et al., 2010). A Figura 3.6 apresenta a produção de biodiesel em duas etapas consecutivas: hidrólise enzimática e esterificação. Na primeira etapa, todos os glicerídeos (mono, di e tri) são convertidos em ácidos graxos livres (AGL) e glicerol de alta pureza usando enzimas como catalisadores na presença de água. Então, os ácidos graxos separados são esterificados com álcool, sendo a reação catalisada por enzimas para produzir ácidos graxos esterificados (AGE) mais puros. A água como um subproduto da segunda reação, é reutilizada na primeira etapa em um processo continuo (POURZOLFAGHAR; ABNISA; AROUA, 2016).

Investigar lipases de baixo custo com elevada eficiência de conversão e otimizar as condições do processo de produção de ácidos graxos livres tem sido os desafios para a produção de biocombustíveis por hidroesterificação e o principal alvo de diversos pesquisadores para a implementação dessa nova técnica em larga escala (TALUKDER et al., 2009, MACHADO et al., 2016).

Figura 3.6 - Fluxograma do processo de hidroesterificação enzimática



Fonte: Adaptado (POURZOLFAGHAR; ABNISA; AROUA, 2016).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Microrganismos

As espécies de *Penicillium* foram isoladas de diferentes *habitats* no campus da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa-MG) pelo Dr. James J. Muchovej do Departamento de Fitopatologia e identificadas/catalogadas no Banco de Culturas do Laboratório de Processos Biotecnológicos e Purificação de Macromoléculas da Universidade Federal de São João del Rei, Campus Centro Oeste (Divinópolis-MG). Para este estudo, foram avaliados: *P. janthinellum* CCT3162*, P. chrysogenum* PC2006*, P. camemberti* AT4461*, P. charlesii* AT4752*, P. oxillicum* RT1778*, P. italicum* AT4421*, P. brevicompactum* AT4457*, P. citrinum* CCT3281, *P. purpurogenum* AT2008 e *P. roqueforti* AT0062. Os fungos foram conservados em tubos de ensaio contendo meio BDA (Batata Dextrose Agar – Difco) sob refrigeração a 4 ^{o}C, sendo repicados a cada dois meses.

4.1.2 Reagentes

Acetona P.A. (99,5% de pureza), Ácido Nítrico (65% pureza) e Ácido fosfórico (85% de pureza) todos Cromoline®, Heptano P.A. (99% de pureza), Clorofórmio (99,8% de pureza), Ácido acético glacial P.A. (99,7% de pureza) todos da marca Synth®, Trifluoreto de boro em solução de metanol Fluka Analytical® (10%), Soluções de Hidróxido de Potássio (KOH) foram preparadas utilizando água destilada e KOH (85% de pureza). Como fonte de carbono para crescimento dos fungos foi utilizado azeite de oliva da marca Carbonell adquirido em mercado local. Os óleos vegetais utilizados no trabalho foram adquiridos de diversos fornecedores: Óleo de coco (Frescoco®), Óleo de canola Purilev® e Óleo de Soja Liza® foram adquiridos em mercados locais. Óleo de palma foi gentilmente doado pela Agropalma (Companhia Refinadora da Amazônia) e o Óleo de Macaúba (polpa) da Associação de pequenos trabalhadores rurais de Riacho D'antas.

4.2 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados na reação estão listados no Quadro 4.1.

Quadro 4.1 - Principais equipamentos utilizados durante a realização do trabalho.

Tipo de análise e/ou experimento	Equipamento	Modelo/Fabricante
Agitação	Agitador mecânico	Modelo MA-1039 (Marconi)
Agitação com controle de temperatura	Placa com agitação magnética e controle de temperatura	Modelo MR-3001 (Heidolph)
Manutenção de temperatura	Banho termostático	Modelo MA-184/6 (Marconi)
Medidas de pH	Potenciômetro	Modelo TEC2 (Tecnal)
Teor de umidade	Balança analítica	ID 50, Marte (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda.)
Remoção de solventes voláteis	Rotaevaporador	Modelo 801 (Fisatom)
Cultivo de microrganismos	Incubadora Refrigerada	Modelo MA-830 (Marconi)
Reação de Hidrólise	Ultrassom	Unique®

Fonte: Próprio autor

4.3 Metodologia Experimental

4.3.1 Preparo do meio de cultura e inoculação

Os fungos foram cultivados em meio de cultura líquido composto por óleo de oliva (comercial) 30 g/L, peptona (Himedia) 70 g/L, $NaNO_3$ (Vetec) 1 g/L, KH_2PO_4 (Synth) 1 g/L e $MgSO_4.7H_2O$ (Vetec) 0,5 g/L, previamente autoclavado (121 °C/15 min).

Para preparo do inoculo, os esporos de cada fungo foram raspados, suspensos em água estéril e submetidos à agitação até a obtenção de uma suspensão. A concentração de esporos na suspensão foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Um volume contendo $1x10^6$ esporos de cada espécie de fungo foi inoculado em Erlenmeyers, os quais foram incubados por 72 h a 30 °C sob agitação orbital em incubadora refrigerada MA-830 (Marconi ^{MR}) a 180 rpm.

4.3.2 Testes de seleção das espécies de *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio

A seleção das espécies de *Penicillium* produtores de lipase ligada ao micélio foi efetuada por meio do crescimento dos fungos em meio líquido contendo azeite de oliva como fonte de carbono e nutrientes, conforme descrito no item 4.3.1. Após 72 h de cultivo, o micélio foi separado do caldo fermentativo por meio de filtração à vácuo e lavado com água e acetona para remoção do azeite residual e efetuadas as análises de interesse. Foram quantificadas a concentração de biomassa celular, atividade lipolítica da biomassa e do caldo fermentado (lipase extracelular). A umidade no micélio foi determinada em balança de secagem acoplada a lâmpada de infravermelho (Marte, Modelo ID 50). Em todos os experimentos, um frasco contendo apenas o meio de cultura autoclavado era utilizado como controle negativo.

4.3.3 Determinação das propriedades bioquímicas e cinéticas

As lipases das diferentes espécies do gênero *Penincillium* foram caracterizadas quanto as suas propriedades bioquímicas, por meio da determinação dos valores otimizados de pH e temperatura. Em uma primeira etapa, os ensaios de atividade foram realizados, conforme descrito no item 4.4.1, entretanto, variando o pH do tampão fosfato na faixa de 5,5 a 8,0, fixando a temperatura em 37 ºC. Uma vez determinado o valor ótimo de pH, ensaios adicionais foram realizados em uma faixa de temperatura de 30 a 50 ºC, visando determinar o valor otimizado desta variável.

A estabilidade térmica das enzimas foi também avaliada. Inicialmente, 0,1 g de biomassa (base seca) foi adicionada em tubos de ensaios contendo 5 mL de solução tampão fosfato (0,1 M, pH 7) e incubadas durante 2,5 h em banho termostatizado a 50 ºC. Estas suspensões foram então retiradas do sistema de aquecimento a cada 30 min e imediatamente resfriadas em banho de gelo. Após esta etapa, as suspensões foram incorporadas a emulsão contendo o substrato descrito no item 4.4.1, e as atividades residuais determinadas pelo método de hidrólise do azeite de oliva. Para o cálculo da constante de inativação (*kd)* e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foram utilizadas as equações 4.1 e 4.2, respectivamente.

$$A = A^0 \exp(-kd.\ t) \qquad (4.1)$$

$$t_{1/2} = \ln 0{,}5/-kd \qquad (4.2)$$

Com o intuito de verificar a influência da concentração do substrato sobre a atividade das lipases, foram preparados meios emulsificados contendo diferentes proporções de azeite de oliva (10-60%) correspondendo a concentrações em ácidos graxos variando entre 372 a 2232 mM. A atividade hidrolítica de cada lipase foi quantificada nesses substratos, de acordo com a metodologia descrita em 4.4.1. Os parâmetros cinéticos: constante cinética de Michaelis-Menten (Km) e velocidade máxima de reação (*Vmax*) foram determinadas de acordo com o sistema gráfico de Lineweaver-Burk, utilizando o software Origin Pro 8®.

4.3.4 Reações de hidrólise de óleos vegetais

O método consistiu no monitoramento da reação de hidrólise empregando diferentes óleos vegetais (coco, canola, macaúba, palma e soja) utilizando como catalisador as lipases das espécies previamente selecionadas, visando mensurar a liberação de ácidos graxos, em intervalos de tempo pré-estabelecidos. Parâmetros reacionais, tais como pH e temperatura foram fixados em valores determinados como ótimo para atuação de cada lipase. O substrato foi preparado pela adição direta do agente emulsificante, goma arábica (3% m/v), aos óleos. Em reatores encamisados de 100 mL foram adicionados 50 mL do substrato contendo 25 % dos diferentes óleos, pH fixo utilizando tampão fostato (0,1 M, pH 7) e relação fixa em unidades de atividades das diferentes lipases espécies em 410 U/g de óleo com agitação mecânica (300 rpm), como demonstrado na Figura 4.1. Periodicamente foram retiradas amostras de 0,5 g do meio reacional e o teor de ácido graxo quantificado por titulação com KOH 0,025 mol/L.

A conversão foi calculada pela determinação da concentração de ácidos graxos formados durante a reação de hidrólise dos triacilgliceróis presente no substrato, de acordo com a equação 4.3 (ROONEY; WEATHERLEY, 2001).

$$\text{Hidrólise } (\%) = \frac{(Va - Vb) * N * 10^{-3} * M}{m * f} * 100 \qquad (4.3)$$

Va = volume de KOH da amostra (mL);
Vb = volume de KOH do controle (mL);
N= normalidade do KOH;
M= massa molecular média dos ácidos graxos no óleo vegetal (g/mol);
m= massa da amostra (g); *f* = fração de óleo usada.

Figura 4.1 - Esquema das reações de hidrólise

Fonte: Próprio autor

4.3.5. Estudo de alguns parâmetros de reações de hidrólise

As reações que obtiveram os melhores resultados de hidrólise foram repetidas, porém, utilizando Erlenmeyers de 125 mL acoplado a um banho ultrassônico Unique Ultrassonic Cleaner® mantendo o modulador de frequência a 40 kHz em uma potência de 132W. Foram adicionados a biomassa e o substrato seguindo as mesmas condições e proporções do item 4.3.4, como demonstrado na Figura 4.2. Alíquotas (0,5 g) foram retiradas de hora em hora durante 8 horas e a conversão calculada seguindo a equação 4.3.

Figura 4.2 - Esquema das reações de hidrólise acopladas ao banho ultrassônico

Fonte: Próprio autor

4.3.5.1 Reações de hidrólise utilizando diferentes concentrações de substrato

Seguindo a metodologia utilizada no item 4.3.5, reações de hidrólise foram também realizadas, alterando a razão óleo/água (25, 35 e 50% m/m) sob a irradiação de ondas ultrassonoras visando avaliar a influência da concentração do substrato no grau de hidrólise alcançado pelas lipases das espécies previamente selecionadas.

4.3.6 Separação e recuperação dos produtos de hidrólise

A reação de hidrólise foi finalizada adicionando-se ao reator, uma mistura de 90 mL de clorofórmio e 25 mL de ácido acético glacial, com homogeneização por 10 min, sob agitação. Em seguida, o conteúdo do reator foi transferido para uma proveta de 500 mL e o volume completado com água destilada. Posteriormente, o conteúdo da proveta foi transferido para um funil de separação e deixado em repouso para a separação das fases (AOAC, 1990).

A fase clorofórmica, contendo ácidos graxos livres foi metilada e identificados por cromatografia de fase gasosa. A metilação da fase orgânica foi realizada segundo metodologia (AOCS Ce 2-66, 2003). Inicialmente as amostras do hidrolisado (250 mg) foram colocadas em um balão de fundo chato de 100 mL e adicionados 4 mL de trifluoreto de boro (BF_3) em metanol (10%). Após esta etapa, o balão conectado a condensador de refluxo foi colocado numa placa de aquecimento a 60 ºC por 10 min. Decorrido este tempo, adicionaram-se 5 mL de heptano ao sistema através do condensador e aguardou-se 1 min. Em seguida, desligou-se o aquecimento e mantendo a agitação constante, foram adicionados 15 mL de solução salina (NaCl) saturada mantendo a agitação por mais 30 segundos. Foi desconectado o condensador do balão e adicionou-se ao sistema solução saturada de NaCl suficiente para o sobrenadante alcançar o gargalo do balão. Transferiu-se 1 mL da solução do sobrenadante para um béquer e adicionou-se sulfato de sódio (Na_2SO_4) para retirada da umidade. O sobrenadante contendo a solução seca de ésteres foi armazenado e analisado por cromatografia gasosa.

4.4 Métodos de Análise

4.4.1 Determinação da atividade hidrolítica

As atividades enzimáticas da biomassa celular e dos filtrados foram determinadas pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia descrita por Andrade et al. (2012) com modificações, variando o tempo de reação. O substrato foi preparado pela

emulsão de 10 mL de azeite de oliva e 90 mL de goma arábica a 3% (m/v). Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados: 5 mL de substrato, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e 0,3 g de células (massa seca) ou 0,5 g do caldo fermentado. Os frascos foram incubados a 37 °C por 10 min, em banho termostatizado com agitação. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura de acetona, etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,020 M, utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram efetuados pela Equação 4.4 e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em moles/g.min (U/g).

$$Atividade = \frac{(VA-VB)\ .M.10^3}{t.m} \qquad (4.4)$$

Em que: *VA* = volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL); *VB* volume do KOH gasto na titulação do branco (mL); *M* = molaridade da solução de KOH (M); *t* = tempo de reação (min); *m* = massa (g).

4.4.2 Teor de umidade

A umidade da biomassa livre foi aferida diretamente em uma balança de secagem acoplada com lâmpada de infravermelho (Marte ID 50) nas condições previamente estabelecidas.

4.4.3 Determinação dos ésteres de metila por cromatográfica gasosa

Os ácidos graxos liberados na hidrólise foram analisados por cromatografia em fase gasosa. As amostras submetidas à análise cromatográfica foram previamente metiladas, conforme descrito no item 4.3.6 e os ésteres metílicos identificados por cromatografia em fase gasosa (Varian, Modelo 3800), empregando uma coluna capilar TR FAME específica para ésteres metílicos (FAME-Varian), com 30 m de comprimento, 0,25 mm diâmetro interno e 0,25 μm de filme. As condições utilizadas foram: fluxo de nitrogênio 1 mL/min, temperatura do injetor a 200 ºC e detector a 250 ºC. A temperatura da coluna foi programada para 50 ºC por 1 min com taxa de elevação de 15 ºC /min até a temperatura de 150 ºC, imediatamente a temperatura foi elevada para 180 ºC, com taxa de aquecimento de 2 ºC/min e elevando na sequência a 250 ºC com taxa de 15 ºC /min, estabilizando por 5 min, totalizando em 32 min o tempo global de análise. A identificação dos ácidos graxos foi realizada comparando-se os tempos de retenção com padrões FAME (Sigma) e a

quantificação foi realizada por normalização de áreas calculadas pelo software Galaxie Chomatography Data System version 1.9. Os padrões utilizados e seus respectivos tempos de retenção são apresentados na Tabela 4.1, e o cromatograma referente ao padrão contendo uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos (C 5:0 a C21:1) é apresentado no Apêndice A.

Tabela 4.1 - Determinação do tempo de retenção dos ésteres metílicos

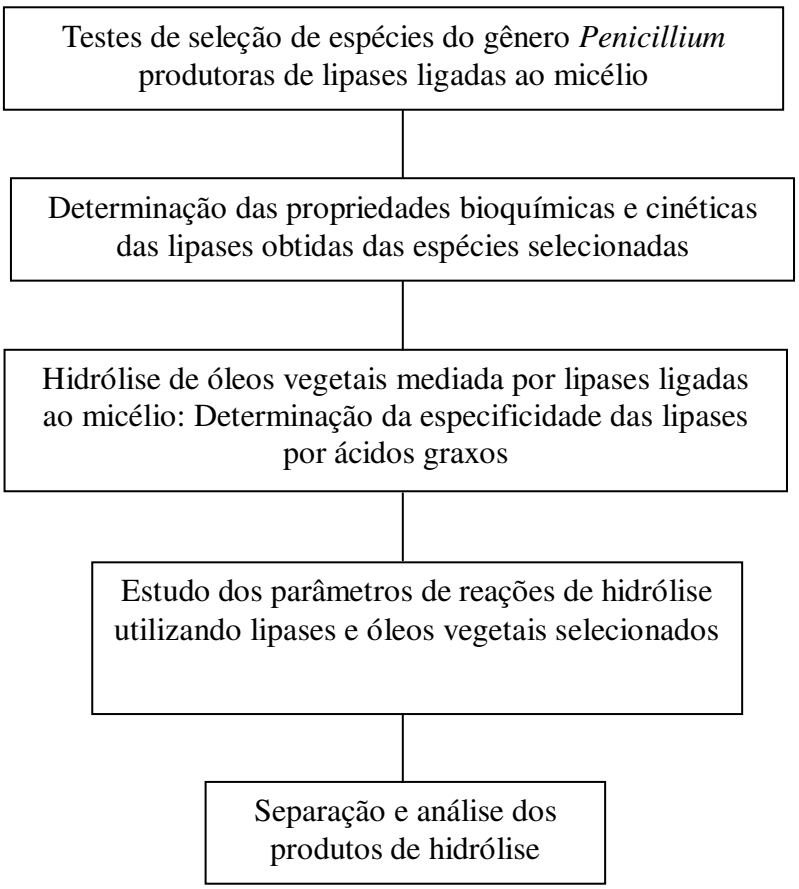
Composto	**Tempo de retenção (min)**
C5:0 Ácido Valérico	4,0
C6:0 Ácido Capróico	4,8
C7:0 Ácido Heptílico	5,5
C8:0 Ácido Caprílico	6,3
C9:0 Ácido Pelargônico	7,0
C10:0 Ácido Cáprico	7,6
C11:0 Ácido Undecílico	8,3
C12:0 Ácido Láurico	9,2
C13:0 Ácido Tridecílico	10,0
C14:0 Ácido Mirístico	11,1
C15:0 Ácido Pentadecílico	12,3
C16:0 Ácido Palmítico	13,8
C16:1 Ácido Palmitoléico	14,5
C17:0 Ácido Margárico	15,6
C18:0 Ácido Esteárico	17,5
C18:1 Ácido Oleico	18,3
C18:2 Ácido Linoléico	19,7
C18:3 Ácido Linolênico	21,5
C19:0 Ácido Nonadecílico	22,0
C20:0 Ácido Araquídico	23,9
C21:0 Ácido Behenico	24,9
C21:1 Ácido Erucato	25,8

Fonte: Próprio autor

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capitulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento do trabalho experimental. Os experimentos foram realizados de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 5.1, que auxilia no entendimento da sequência experimental adotada.

Figura 5.1 - Fluxograma da sequência experimental efetuada



Fonte: Próprio autor

5.1 Seleção dos fungos produtores de lipase ligadas ao micélio

O trabalho experimental foi inicialmente direcionado para testes de seleção das espécies do gênero *Penicillium* com maior potencial de produzir lipase ligada ao micélio. Para tanto, 10 espécies de fungos filamentosos descritos como bons produtores de lipase foram cultivados em meio de cultura líquido composto por óleo de oliva e nutrientes adequados, por um período máximo de 72 h e agitação de 180 rpm, conforme descrito na seção 4.3.1. Todos os cultivos foram realizados em triplicata e os valores médios de biomassa seca e as atividades lipolíticas no filtrado e na biomassa ao final de 72 h de cultivo, bem como a relação entre as atividades na biomassa (ligada ao micélio) e atividade no filtrado (extracelular) estão mostrados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Valores médios de concentração biomassa celular (g/L) e as atividades lipolíticas no filtrado e na biomassa para cada espécie de *Penicillum* após cultivo por 72 h em meio contendo óleo de oliva como fonte de carbono

Espécies	Concentração de biomassa (g/L)	Atividade (U/g)		Relação das atividades (biomassa/ filtrado)
		Biomassa	Filtrado	
P. brevicompactum	13,6 ± 2,1	71,3 ± 12,7	21,0 ± 3,3	3,4
P. camemberti	6,4 ± 0,4	128,9 ± 23,9	27,1 ± 0,4	4,8
P. charlesii	16,5 ± 3,0	129,6 ± 37,1	23,6 ± 2,3	5,5
P. chrysogenum	16,9 ± 2,0	51,1 ± 2,5	22,3 ± 0,2	2,3
P. citrinum	23,8 ± 2,1	81,6 ± 0,4	25,5 ± 5,3	3,2
P. italicum	34,1 ± 2,7	199,3 ± 9,5	19,1 ± 1,0	10,4
P. janthinellum	12,4 ± 2,0	171,1 ± 18,8	21,8 ± 0,4	7,8
P. oxalicum	4,8 ± 1,4	49,9 ± 1,3	14,7 ± 1,1	3,4
P. purpurogenum	30,2 ± 1,1	170,3 ± 17,6	19,5 ± 3,6	8,7
P. roqueforti	16,9 ± 0,3	186,9 ± 57,9	25,3 ± 3,8	7,4

Fonte: Próprio autor

De maneira geral, todos os fungos apresentaram crescimento microbiano regular, alcançando concentrações de biomassa seca variando entre 4,8±1,4 a 34,1±2,7 g/L ao final de 72 h de cultivo. A produção de biomassa mais elevada foi obtida pelo cultivo da espécie *P. italicum* e a menor fornecida pelo cultivo da espécie *P. oxallicum* RT1778.

As espécies *P. chrysogenum* PC2006*, P. roqueforti* AT0062 e *P. charlesii* AT4752*,* forneceram crescimento celular similares, alcançando valores máximos de 16 g/L, entretanto, superiores aos descritos por Lima; Silva; Pinotti, 2014, que relataram concentração de biomassa da ordem de 14,1g/L no cultivo de *Penicillium* sp. por 72 h utilizando óleo de oliva como indutor.

A atividade hidrolítica no micélio variou numa ampla faixa (50 a 199 U/g), dependendo da espécie cultivada, entretanto os baixos valores de atividade hidrolítica determinados nos filtrados (≤ 28 U/g) sugerem que todas as espécies foram capazes de produzir lipase ligada ao micélio nas condições utilizadas no trabalho.

O menor valor de atividade no micélio correspondeu ao desempenho da lipase de *P. oxallicum* RT1778 e o maior valor representa o desempenho da lipase espécie *P. italicum* AT4421. A lipase da espécie *P. camemberti* AT4461 forneceu baixos valores de biomassa celular e atividade.

Verifica-se ainda que quatro espécies apresentaram atividades lipolíticas no micélio superiores a 170 U g^{-1}, *P. roqueforti* (186,9 U g^{-1}), *P. janthinellum* (171,1 U g^{-1}), *P. purpurogenum* (170,3 U g^{-1}) e *P. italicum* (199,3 U g^{-1}), e forneceram baixos valores de atividade no filtrado (em torno de 20 U g^{-1}), resultando em relações entre as atividades lipolíticas do micélio e extracelular maiores que 7.

Estas espécies foram consideradas como potencias fontes de lipase para dar sequência ao estudo, entretanto, a espécie *P. roqueforti* não foi incluída em função de sua disponibilidade comercial (Li; Zong, 2010). Além disso, não existem relatos na literatura de produção de lipases a partir das espécies *P. janthinellum, P. italicum* e *P. purpurogenum*, justificando a motivação desse estudo na busca de novas fontes potencias de lipases ligadas ao micélio.

5.2 Determinação das propriedades bioquímicas e cinéticas das lipases

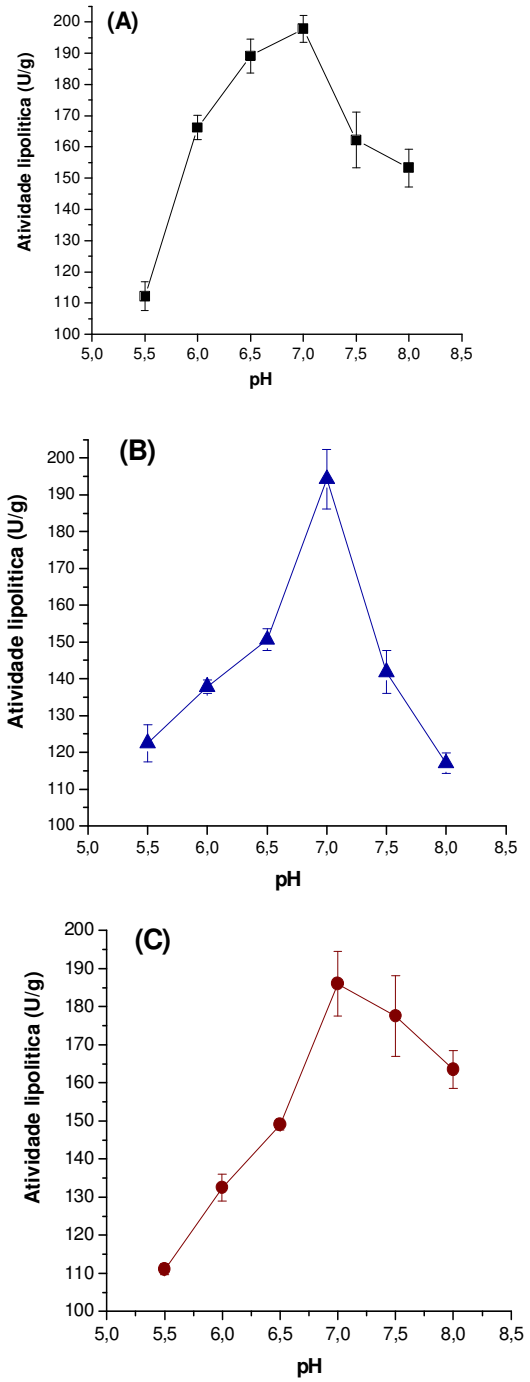
A caracterização das propriedades bioquímicas e parâmetros cinéticos das lipases das espécies selecionadas: *Penicillium italicum, Penicillium janthinellum e Penicillium purpurogenum* foram determinadas visando estabelecer as condições adequadas para aplicação na hidrólise de óleos vegetais.

5.2.1 Determinação do pH ótimo de atuação das lipases

Lipases de diversas fontes apresentam diferentes valores de pH ótimo de atuação. Para investigar a influência do pH no desempenho catalítico das lipases das espécies

selecionadas na reação de hidrólise do óleo de oliva, variou-se o pH do meio de reação na faixa de 5,5 a 8,0, fixando a temperatura de incubação em 37 ºC. A Figura 5.2 apresenta os perfis de atividade obtidos com a variação do pH do meio reacional.

Figura 5.2 - Influência do pH na atividade lipolítica das lipases ligadas ao micélio de *P. italicum* **(A)**, *P. janthinellum* **(B)** e *P. purpurogenum* **(C)**.



Fonte: Próprio autor

Com base nas condições estudadas, verifica-se que todas as lipases avaliadas apresentaram valores mais elevados de atividade (aproximadamente 200 U/g) em pH 7,0. As lipases de *P. italicum* (Figura 5.2 A) e de *P. purpurogenum* (Figura 5.2 C) não sofreram influência marcante do pH na faixa alcalina (pH> 7,0) apresentando valores de atividade apenas 25% menores em relação ao pH ótimo de atuação. A lipase de *P. janthinellum* revelou habilidade de atuar com atividade satisfatória (> 140 U/g) numa faixa de pH relativamente mais ampla (6,5 a 7,5). Demonstrando assim, que as lipases das três espécies seleciondas atingem o maior valor de atividade em uma faixa de pH próxima a neutralidade, e sofrem influência negativa em pHs mais ácidos.

Esses resultados, demonstrados na Tabela 5.2, são similares aos reportados por Sivaramakrishnan; Incharoensakdi (2016) referentes a determinação do valor de pH ótimo para atuação de lipases purificadas de *Bacillus* sp. Na faixa de variação de pH entre 4 a 8, os autores verificaram que o valor ótimo de atividade se encontrava entre 6 e 7,5, porém, com queda acentuada na atividade, alcançando um valor residual menor que 30%, quando empregado valores de pH mais ácidos ou básicos.

Tabela 5.2 - Faixas de valores de pH para cada lipase selecionada

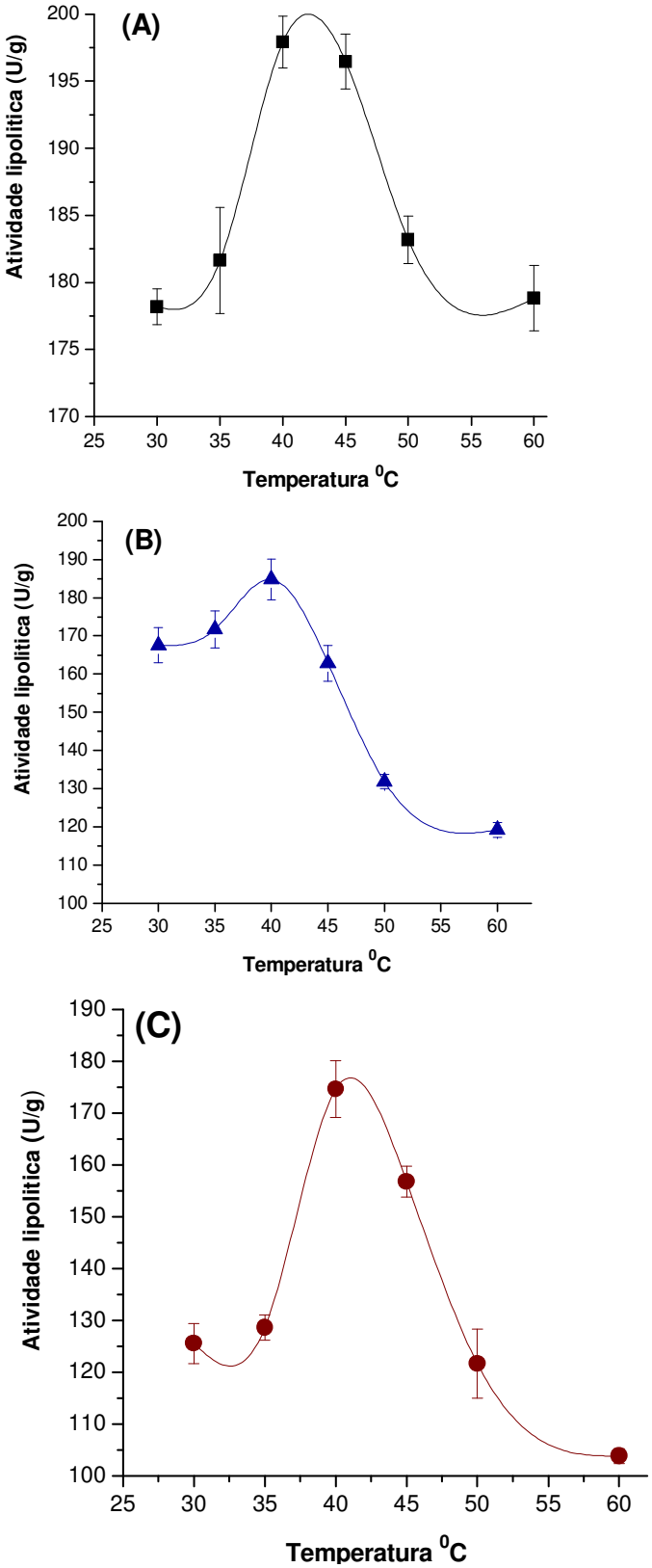
Lipases	**Faixa de pH**
P. italicum	6,5 - 7,0
P. janthinellum	6,5 – 7,5
P. purpurogenum	7,0 – 7,5

Fonte: Próprio autor

5.2.2 Determinação da temperatura ótima de atuação das lipases

Para a determinação da temperatura ótima de atuação das lipases das espécies selecionadas, variou-se a temperatura de incubação entre 30 a 60 °C em seus respectivos valores de pH ótimos de atuação, empregando como substrato emulsão de óleo de oliva, conforme metodologia descrita no item 4.3.3. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 5.3 (A-C).

Figura 5.3 - Influência da temperatura na atividade lipolítica das lipases de *P. italicum* **(A)**, *P. janthinellum* **(B)** e *P. purpurogenum* **(C).**



Fonte: Próprio autor

Na Figura 5.3 A, verifica-se que a lipase de *P. italicum* apresentou o valor mais elevado de atividade lipolítica (aproximadamente 200 U/g) na faixa de temperatura entre 40 a 45 ^{o}C, quando comparado as outras duas lipases, *P. purpurogenum* e *P. janthinellum*, as quais apresentaram atividade máxima de cerca de 180 U/g, à 40 e 35-40 ^{o}C, respectivamente (Figuras 5.3B, 5.3C). Ainda de acordo com a Figura 5.3 A, nota-se que a lipase de *P. italicum* apresentou melhor atuação na faixa de temperatura avaliada, uma vez que a variação da atividade catalítica foi inferior à demonstrada pelas demais espécies, as quais foram fortemente afetadas pelo aumento da temperatura de incubação superior a 40°C.

Costa e Peralta (1999) verificaram que a lipase da espécie *P. wortmanii* apresentou valores de atividade ótima na mesma faixa encontrada no presente trabalho (40-45 ºC). Na Tabela 5.3 é possível observar as diferentes faixas de temperatura ótima de atuação para cada lipase selecionada.

Tabela 5.3 - Faixas de temperatura de atuação das lipases das espécies selecionadas

Lipases	**Faixa de temperatura (°C)**
P. italicum	40 -45
P. janthinellum	35-40
P. purpurogenum	40-45

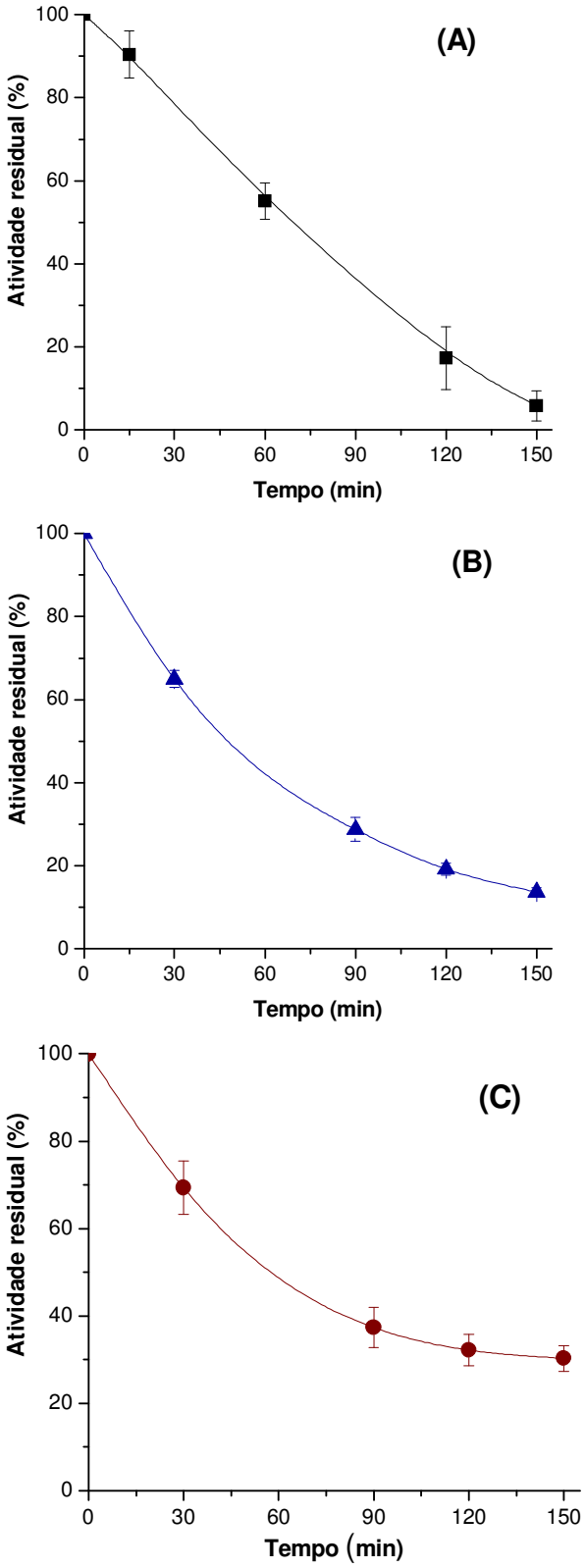
Fonte: Próprio autor

5.2.3 Determinação da estabilidade térmica das lipases de *Penicillium* avaliadas

Um aumento de temperatura, geralmente corresponde a um aumento na velocidade de reação por unidade de enzima. Entretanto, um aumento de temperatura também pode promover aumento na velocidade de desnaturação térmica da lipase, reduzindo, portanto, a velocidade de formação de produto.

Para o estudo da estabilidade térmica das lipases ligadas ao micélio, as células íntegras foram submetidas a tratamento térmico a 50 ºC por 2,5 h, resultando em valores de atividade residuais como visualizados na Figura 5.4.

Figura 5.4 - Estabilidade térmica (50 °C) das lipases ligadas ao micélio de *P. italicum* (A), *P. janthinellum* (B) *e P. purpurogenum* (C).



Fonte: Próprio autor

Verifica-se que a lipase de *P. italicum*, apresentou retenção de atividade superior a 90% nos primeiros 15 min de incubação, entretanto após esse período, a atividade decresceu proporcionalmente ao tempo de tratamento, alcançando perdas da atividade superior a 95%. Em relação às lipases das demais espécies, nota-se menor redução na atividade, revelando desativação térmica menos severa.

A lipase de *P. purpurogenum* (Figura 5.4 C) foi a que apresentou maior retenção de atividade lipolítica (30%) ao final do tratamento (2,5 h) quando comparada com as lipases de *P. janthinellum* (Figura 5.4B) e *P. italicum* (Figura 5.4 A), cujas atividades residuais foram inferiores a 15%.

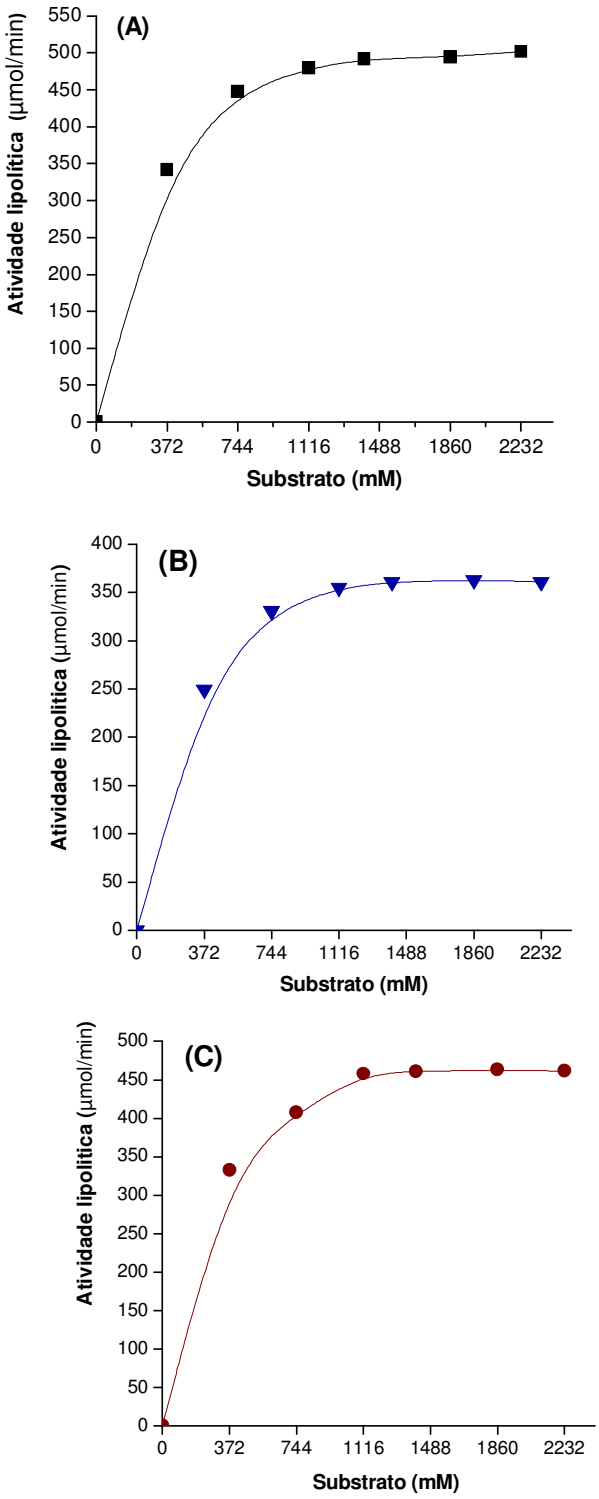
Com base nos resultados obtidos, foram determinadas as constantes de inativação térmica (*kd*) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), para cada lipase avaliada. A menor estabilidade térmica foi observada para lipase de *P. italicum* revelando valores de constante de desativação térmica (*kd*) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de 0,76 h^{-1} e 0,92 h, respectivamente. As lipases de *P. janthinellum* e *P. purpurogenum* forneceram valores de *kd* correspondentes à 0,62 e 0,57 h^{-1} e de $t_{1/2}$ da ordem de 1,17 e 1,21 h, respectivamente.

5.2.4 Determinação dos parâmetros cinéticos das lipases ligadas ao micélio

Para verificar o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de reação hidrolítica das lipases das espécies avaliadas, variou-se a porcentagem do óleo de oliva na emulsão na faixa de 10 a 60% (v/v), correspondendo a concentrações em ácidos graxos entre 372 a 2232 mM. Os ensaios foram conduzidos no valor de pH ótimo para cada preparação de lipase e na temperatura de 37 °C.

A Figura 5.5 (A-C) apresenta as curvas de saturação do substrato para as lipases das diferentes espécies, indicando que o aumento na concentração do substrato de 372 para 1116 mM resultou em incrementos significativos nas velocidades de reação para todas as preparações de lipase ensaiadas. Para concentrações de substrato superiores a 1488 mM, a velocidade de formação dos produtos tornou-se essencialmente independente da concentração do substrato, seguindo uma cinética do tipo Michaelis-Menten (MARTINELLE HULT, 1994). Os dados obtidos foram linearizados utilizando o sistema gráfico de Lineweaver-Burk, conforme apresentado no Apêndice B, demonstrando assim ser uma cinética Michaeliana. Os valores de *Km* e V_{max} aparentes foram calculados com o auxílio do programa Origin 8, conforme apresentados na Tabela 5.4.

Figura 5.5 - Influência da concentração do substrato na atuação das lipases ligadas ao micélio de *P. italicum* (A), *P. janthinellum* (B), *P. purpurogenum* (C). Condições reacionais: 37 ºC, tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0), massa de micélio (0,1 g), 150 rpm e tempo reacional de 5 min.



Fonte: Próprio autor

Tabela 5.4 - Constantes cinéticas de Michaelis-Menten (*Km*) e velocidade máxima de reação (*Vmax*) determinadas de acordo com o sistema gráfico de Lineweaver-Burk

Espécies	**Valores de *Km* (mM)**	**Valores de V_{max} (µmol/min)**
P. italicum	151,3	539,1
P. janthinellum	123,6	387,6
P. purpurogenum	141,4	493,8

Utilizando as propriedades bioquímicas e cinéticas das espécies selecionadas demonstradas nas seções anteriores e sumarizadas na Tabela 5.5, foram realizados testes com o objetivo de verificar o desempenho em reações de hidrólise.

Tabela 5.5 - Caracterização das lipases das espécies selecionadas utilizando como substrato óleo de oliva

Propriedades	**Lipases das espécies selecionadas**		
	P. italicum	*P. janthinellum*	*P. purpurogenum*
pH ótimo	7	7	7
Temperatura ótima (ºC)	40	40	40
Kd (50ºC) (h^{-1})	0,76	0,62	0,57
Tempo meia-vida 50ºC (h^{-1})	0,92	1,17	1,21
Km (mM)	151,3	123,6	141,4
V_{max} (µmol/min)	539,1	387,6	493,4

Fonte: Próprio autor

5.3 Hidrólise de óleos vegetais utilizando as lipases das espécies selecionadas

Para realização desses ensaios, foram utilizados diferentes óleos vegetais na proporção de 25% (m/v), emulsificados com goma arábica (3% m/v), incubados com as lipases das espécies selecionadas *P. italicum, P. janthinellum e P. purpurogenum* numa proporção fixa em unidades de atividade por grama de óleo (410 U/g). Os ensaios foram realizados em duplicata com solução tampão fostato (0,1 M), valor ótimo de atuação de cada espécie e temperatura fixa de 40 °C, com agitação mecânica a 300 rpm.

Visando determinar a especificidade de cada lipase, foram utilizados óleos vegetais ricos em diferentes ácidos graxos (Tabela 5.6), como óleo vegetal láurico (coco), óleo vegetal rico em ácido palmítico (palma), óleo vegetal rico em ácido oleico (canola e macaúba) e óleo vegetal rico em ácido linoleico (soja).

Tabela 5.6 - Composição em ácidos graxos dos diferentes óleos vegetais utilizados nos testes de determinação da especificidade das lipases

Óleo	**Composição em ácidos graxos (% em massa)**					
	Láurico C12:0	Mirístico C14:0	Palmítico C16:0	Esteárico C18:0	Oleico C18:1	Linoleico C18:2
Coco	**44-51**	13-18	8-11	1-3	5-8	1-3
Palma	0,4	1-2	**35-47**	3-6	35-47	6-2
Canola	-	-	4	2	**63**	20
Macaúba	-	-	29	3	**53**	18
Soja	-	-	2-11	3-6	24-31	**49-52**

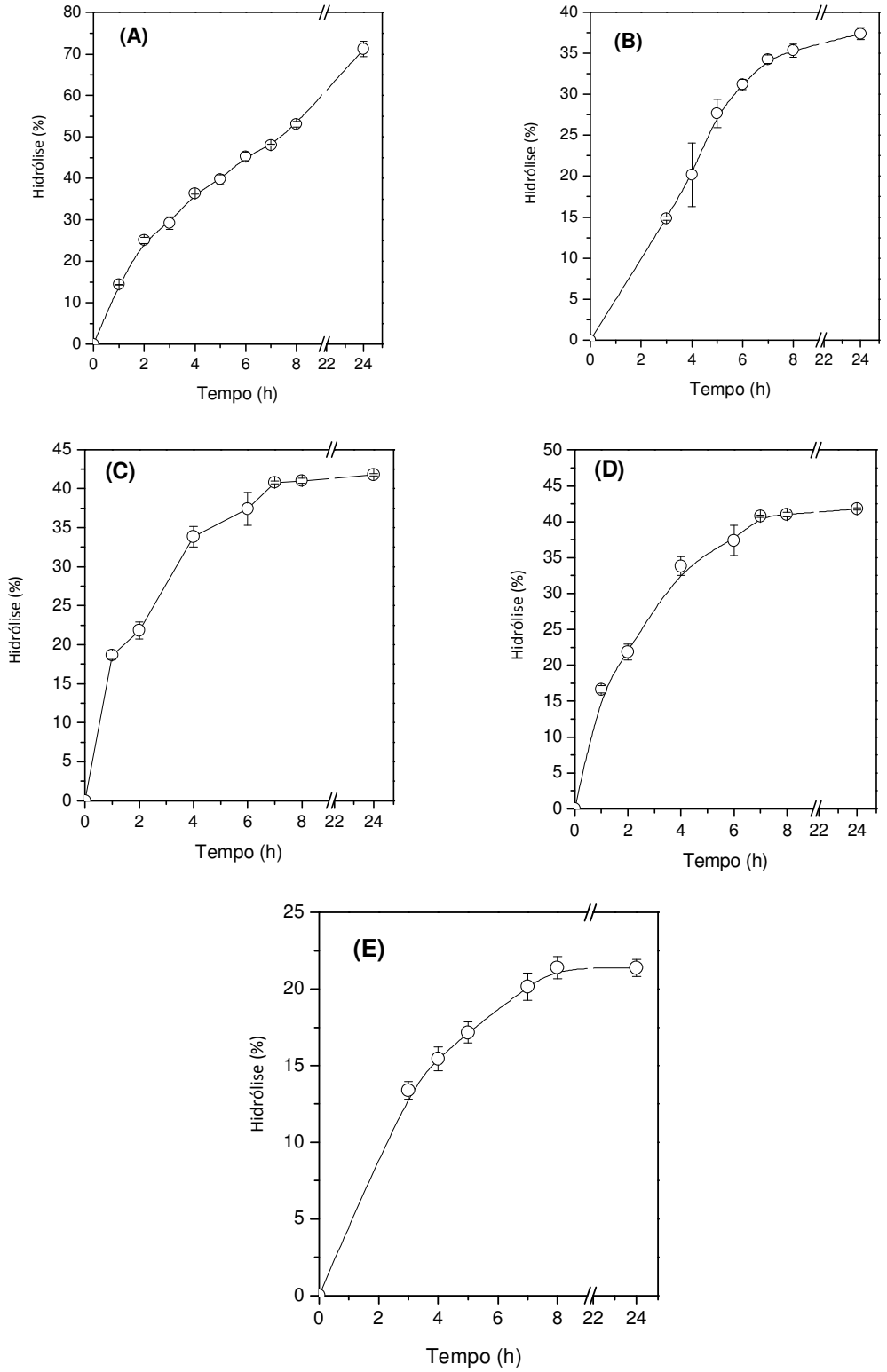
Fonte: Adaptado (RINALDI et al., 2007)

5.3.1 Reações de hidrólise catalisada pela lipase de *Penicillium italicum*

A Figura 5.6 (A-E) apresenta a evolução da hidrólise enzimática dos diferentes óleos vegetais empregando a lipase de *P. italicum* em termos de porcentagem de hidrólise, calculada, conforme descrito na seção 4.3.4.

Os resultados obtidos indicam que a lipase de *P. italicum* foi capaz de hidrolisar os triacilgliceróis presentes nos óleos vegetais testados. As reações ocorreram com velocidade mais elevada nas primeiras 8 h de reação, alcançando graus de hidrólise entre 21,4 a 53,0 %, dependendo do óleo testado.

Figura 5.6 - Perfil da porcentagem de hidrólise enzimática de diferentes óleos vegetais empregando a lipase da espécie *P. italicum*: (A) Canola, (B) Coco, (C) Macaúba, (D) Palma, (E) Soja.



Fonte: Próprio autor

A continuidade da reação por um período adicional de 18 h não proporcionou incrementos expressivos na concentração de ácidos graxos formados, com exceção do observado com o óleo de canola, o qual resultou em um grau de hidrólise da ordem 71,2%. Nas condições testadas não foi observada reversibilidade das reações.

Em termos de formação de ácidos graxos livres, a lipase de *P. italicum* foi mais efetiva na hidrólise do óleo de canola (Figura 5.6 A), alcançando valores superiores a 70% de hidrólise, seguido pelos óleos de palma, macaúba e coco (Figuras 5.6 B, C, D) todos na faixa de 40%. O menor grau de hidrólise (da ordem de 20%) foi obtido para o óleo de soja (Figura 5.6 E), demonstrando seletividade da lipase de *P. italicum* por óleos compostos por elevadas proporções de ácido oleico (canola), porém baixa especificidade para óleos ricos em ácido linolênico (soja).

A observação das Figuras 5.6 A e 5.6 C indica ainda a ocorrência de perfis distintos na atuação da lipase de *P. italicum* utilizando óleos de canola e macaúba, apesar da similaridade da composição em ácidos graxos desses óleos, principalmente em relação ao elevado teor de ácido oleico. Este comportamento pode ser atribuído ao grau de pureza dos óleos empregados que interferiu na porcentagem de ácidos livres no substrato. O óleo de canola de grau comercial alimentício apresenta baixo teor de acidez, enquanto o óleo de macaúba fornecido por empresa de pequeno porte apresenta elevado teor de ácido graxo livre. A Tabela 5.7 lista a acidez inicial dos substratos e a evolução da formação de ácidos graxos durante a reação de hidrólise, bem como o grau de hidrólise alcançado por meio da atuação da lipase de *P. italicum*. Desta forma, verifica-se que o óleo de macaúba em função da acidez inicial acarretou menor formação de ácidos graxos livres quando comparado ao canola, mesmo possuindo composição similar em ácidos graxos.

Tabela 5.7- Perfil de acidez do meio reacional e do grau de hidrólise alcançado na reação de diferentes óleos vegetais utilizando a lipase da espécie *P. italicum*

Óleo vegetal	**Acidez no meio reacional (%)**			**Grau de hidrólise (%)**	
	0h	**8 h**	**24 h**	**8 h**	**24 h**
Canola	5,9±0,5	58,9±0,7	77,1±1,9	53,0	71,2
Coco	1,1±0,1	34,4±0,8	38,5±0,7	33,3	37,4
Macaúba	14,0±0,4	55,1±0,3	55,8±0,2	41,1	41,8
Palma	6,8±0,8	46,3±1,8	47,8±0,5	39,5	41,0
Soja	5,3±0,6	26,8±0,7	26,7±0,6	21,5	21,4

Fonte: Próprio autor

5.3.2 Reações de hidrólise catalisada pela lipase de *Penicillium janthinellum*

Na Figura 5.7 (A-E) é apresentada a evolução da hidrólise enzimática dos diferentes óleos vegetais empregando a lipase de *P. janthinellum* em termos de porcentagem de hidrólise, calculada, conforme descrito na seção 4.3.4. Verifica-se que esta lipase foi capaz de hidrolisar todos os óleos vegetais testados, fornecendo graus de hidrólise variando entre 23,19 a 54,72 %, dependendo do óleo vegetal empregado (Tabela 5.8).

A velocidade de formação de ácidos graxos livres foi mais elevada no início da reação, alcançando praticamente o equilíbrio reacional em 8 h.

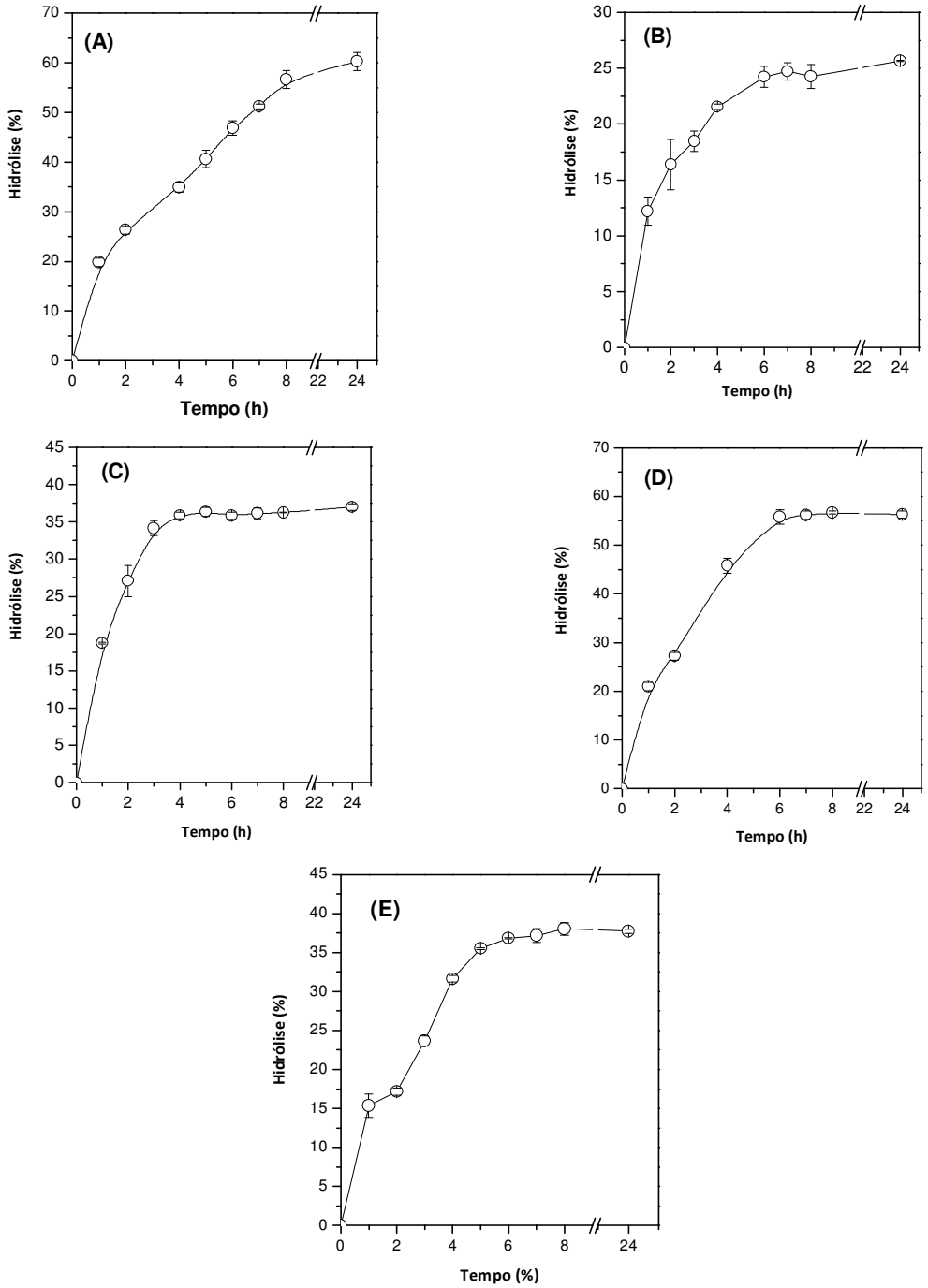
A observação das Figuras 5.7 A e 5.7 D indica que apesar de possuírem composições distintas em ácidos graxos, os óleos de canola e palma, favoreceram a atuação da lipase de *P. janthinellum* revelando graus de hidrólise mais elevados. Esses resultados são similares aos obtidos por Ramani et al. (2010) que reportaram elevado grau de hidrólise (≅ 100%) utilizando lipase purificada de *Pseudomonas gessardi* tanto em óleo de oliva quanto em óleo de palma.

O menor grau de hidrólise foi obtido quando o óleo de coco foi usado como substrato, que possui em sua composição elevada concentração de ácido láurico (Tabela 5.6).

Valores intermediários foram obtidos na hidrólise dos óleos de macaúba (Figura 5.7 C) e soja (Figura 5.7 E), fornecendo graus de hidrólise da ordem de 35%. Apesar da similaridade da composição do óleo de canola e macaúba (Tabela 5.8), foram obtidos graus de hidrólise diferentes, em função da elevada acidez inicial do óleo de macaúba, sendo este, fator relevante para a catálise, acarretando menor atividade hidrolítica da lipase *P. janthinellum,* como anteriormente constatado em relação as reações catalisadas pela lipase *P. italicum*.

A Tabela 5.8 lista a acidez inicial dos substratos e a evolução da formação de ácidos graxos durante a reação de hidrólise, bem como o grau de hidrólise alcançado por meio da atuação da lipase de *P. janthinellum,* demonstrando também a limitação desta lipase em fornecer hidrolisados de óleos com elevada acidez inicial.

Figura 5.7. Perfil da porcentagem de hidrólise enzimática de diferentes óleos vegetais empregando a lipase da espécie *P. janthinellum* (A) Canola, (B) Coco, (C) Macaúba, (D) Palma, (E) Soja.



Fonte: Próprio autor

Tabela 5.8 - Perfil de acidez do meio reacional e do grau de hidrólise alcançado na reação de diferentes óleos vegetais utilizando a lipase da espécie *P. janthinellum*

Óleos vegetais	Acidez no meio reacional (%)			Grau de hidrólise (%)	
	0h	8h	24h	8h	24 h
Canola	5,55±0,65	56,61±1,81	60,27±1,80	51,06	54,72
Coco	0,95±0,08	24,25±1,06	25,65±0,07	23,30	24,70
Macaúba	13,81±0,89	36,23±0,04	37,00±0,46	22,42	23,19
Palma	6,48±0,82	56,67±0,32	56,28±0,70	50,19	49,80
Soja	5,30±1,01	38,02±0,82	37,72±0,25	32,72	32,42

Fonte: Próprio autor

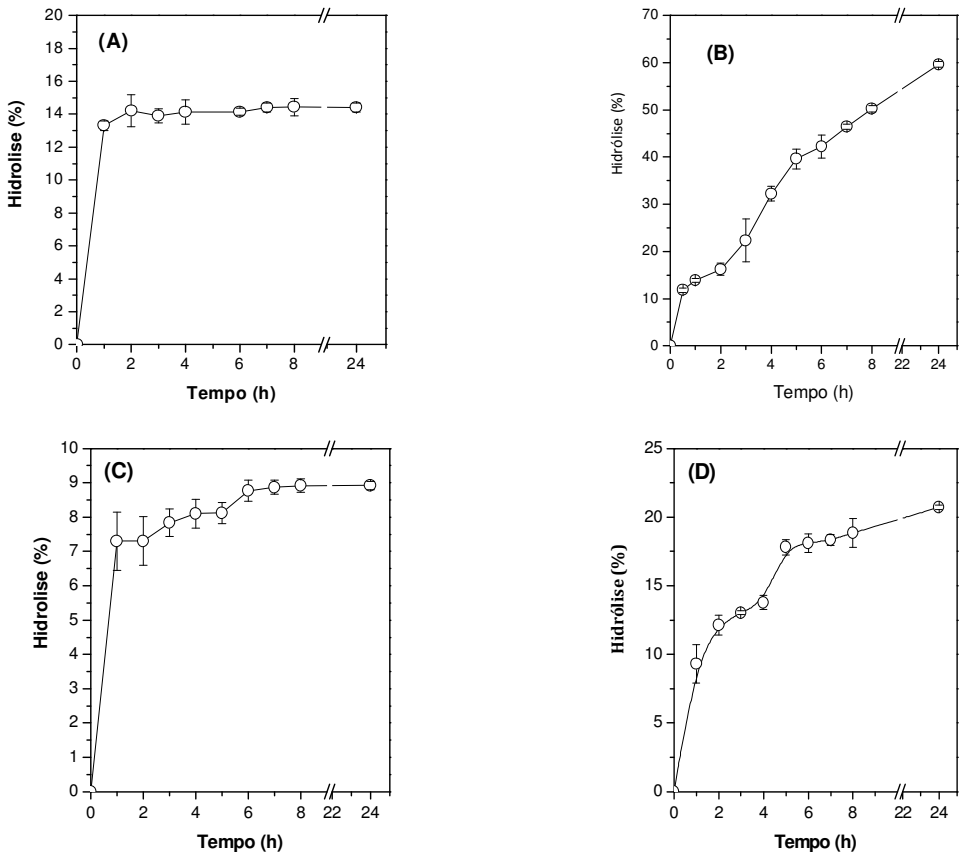
5.3.3. Reações de hidrólise catalisada pela lipase de *Penicillium purpurogenum*

Analisando a Figura 5.8 (A-D) verifica-se a evolução da hidrólise enzimática dos diferentes óleos vegetais empregando a lipase de *P. purpurogenum* em termos de porcentagem de hidrólise. É possível notar que esta lipase teve um desempenho limitado em praticamente todos os óleos vegetais (grau de hidrólise < 23 %), com exceção do óleo de coco que forneceu grau de hidrólise da ordem de 60%. Constata-se ainda que nas primeiras horas de reação a concentração de ácidos graxos liberados foi expressiva permitindo o alcance do valor máximo de hidrólise em 8 h de reação.

Diferentemente das outras duas lipases, verifica-se que a lipase de *P. purpurogenum* tem forte especificidade por óleos compostos de ácidos graxos saturados de cadeia média, como o óleo de coco rico em ácido láurico (Figura 5.8 B).

Segundo Padilha e Augusto-Ruiz (2009) a presença de duplas ligações *cis* de carbono-carbono em ácidos graxos resulta em dobras nas cadeias e o grupo metil terminal dos ácidos graxos, fecha-se em direção à ligação éster, o qual pode causar um obstáculo espacial para a atuação de algumas lipases. Esta configuração pode ser uma justificativa para explicar os baixos graus de hidrólise alcançados pela lipase *P. purpurogenum* em óleos vegetais contendo elevadas proporções de ácidos graxos insaturados. Verifica-se na Tabela 5.12, que os menores graus de hidrólise com valores inferiores a 15% (Tabela 5.6) foram alcançados quando foram utilizados os óleos de canola e macaúba que possuem em sua composição basicamente, ácidos graxos insaturados.

Figura 5.8 - Perfil da porcentagem de hidrólise enzimática de diferentes óleos vegetais empregando a lipase da espécie *P. purpurogenum*. (A) Canola, (B) Coco, (C) Macaúba, (D) Palma.



Fonte: Próprio autor

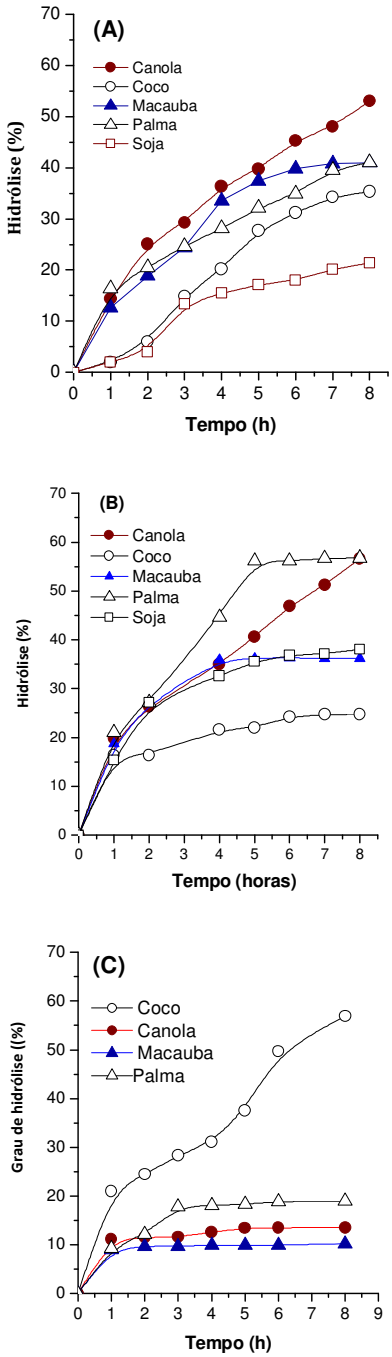
Tabela 5.9 - Perfil de acidez do meio reacional e do grau de hidrólise alcançado na reação de diferentes óleos vegetais utilizando a lipase da espécie *P. purpurogenum.*

Óleos vegetais	Acidez no meio reacional (%)			Grau de hidrólise (%)	
	0 h	8h	24h	8h	24 h
Canola	5,55±0,65	19,65±0,43	20,10±0,53	14,1	14,6
Coco	0,95±0,08	51,24±0,65	60,65±0,63	50,29	59,7
Macaúba	13,81±0,89	22,72±0,19	22,73±0,92	8,91	8,92
Palma	6,48±0,82	28,92±1,04	30,0±0,17	22,44	23,52

Fonte: Próprio autor

Para melhor ilustração dos resultados obtidos, as Figuras 5.9 (A-C) apresentam curvas do progresso da hidrólise para cada lipase utilizando todos os óleos testados, nas quais ficam evidenciadas a especificidade de cada lipase para um determinado tipo de óleo vegetal.

Figura 5.9 - Seletividade das lipases testadas para óleos vegetais contendo diferentes composições em ácidos graxos (canola, coco, macaúba, palma e soja): lipase de *P. italicum* (A), lipase de *P. janthinellum* (B), lipase *P. purpurogenum* (C).



Fonte: Próprio autor

A Tabela 5.10 apresenta as lipases das espécies que demonstraram maior especificidade com os óleos testados. Portanto, quando se trata das lipases das espécies *P. italicum* e *P. janthinellum* verifica-se maior especificidade para o óleo de canola que apresenta em sua composição, ácido oleico como componente majoritário. Por outro lado, a lipase da espécie *P. purpurogenum*, demonstrou elevada especificidade apenas para o ácido láurico componente majoritário do óleo de coco.

Tabela 5.10 - Melhores associações lipase /óleo vegetal em porcentagem de hidrólise

Lipase	Óleo Vegetal	Ácido graxo majoritário	Grau de hidrólise (%)
P. italicum	Canola	C18:1 ≈ 60%	53,0
P. janthinellum	Canola	C18:1 ≈ 60%	51,1
P. purpurogenum	Coco	C12:0 ≈ 50%	50,3

Fonte: Próprio autor

Baseado nos resultados obtidos, experimentos adicionais foram conduzidos visando aumentar o grau de hidrólise por meio de irradiação de ondas ultrassonoras. Foi também verificado o efeito da concentração de substrato no grau de hidrólise. Esses testes foram realizados por um período máximo de 8h, tomando por base que a continuidade da reação de hidrólise por períodos mais longos (24h) não proporciona incrementos expressivos na formação de ácidos graxos.

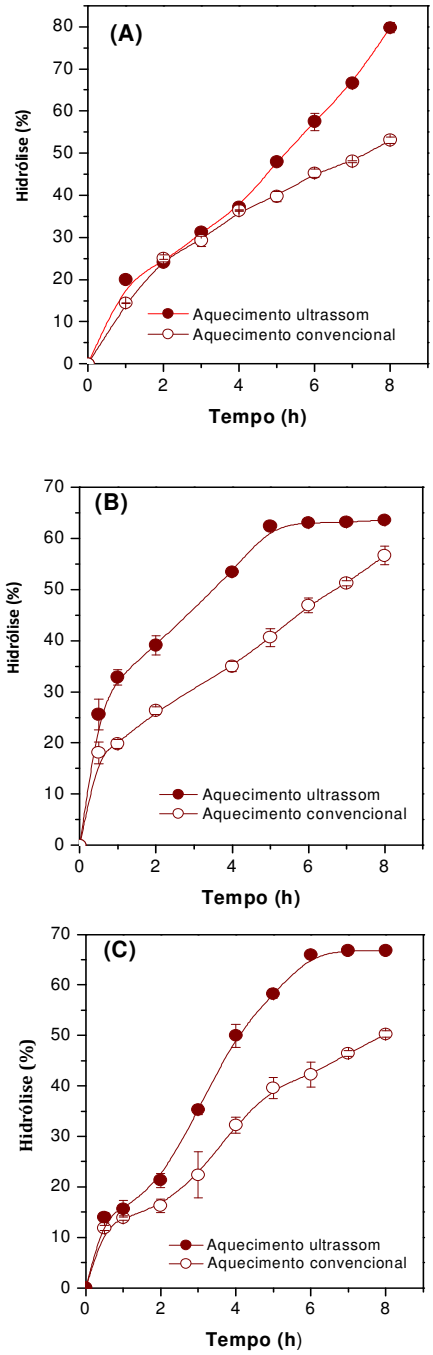
5.4 Estudo de parâmetros que interferem nas reações de hidrólise

5.4.1 Efeito do uso de ultrassom

Os efeitos físicos do ultrassom que devem ser considerados em bioprocessos são o aumento da temperatura, melhor transferência de massa, cavitação estável e transitória (BABICKZ, 2009). Portanto, a combinação da irradiação por ondas ultrassonoras e agitação mecânica pode tornar o processo mais eficiente aumentando a difusão de substratos para os sítios ativos da enzima, resultando em elevadas conversões em menor tempo.

Com base nos resultados obtidos no item 5.4.3, as melhores associações óleos/espécies determinadas foram utilizadas em reações irradiadas em banho ultrassônico, mantendo fixas as demais condições reacionais. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 5.10 (A-C).

Figura 5.10 - Perfis de hidrólises utilizando as lipases das espécies *P. italicum* e óleo de canola (A), *P. janthinellum* e óleo de canola (B) e *P. purpurogenum* e óleo de coco (C) sob aquecimento convencional (círculo aberto) e sob irradiação de ultrassom (círculo fechado). Condições reacionais: temperatura de 40 °C, pH 7, carregamento de lipase 410 unidades de atividade por grama de óleo.



Fonte: próprio autor

Verifica-se que as curvas de progresso da hidrólise mostradas na Figura 5.10 (A-C) apresentam comportamento distinto com relação a reação irradiada por ondas sonoras e sistema convencional, destacando o desempenho mais elevado para as reações conduzidas sob irradiação de ultrassom para todas as lipases testadas.

Em todas as reações foi constatado maior produção de ácidos graxos livres, bem como aumento na velocidade de reação. É possível observar na Figura 5.10 (B) que num tempo reacional de 5 h, o valor máximo de formação de ácidos graxos livres pela lipase de *P. janthinellum* já tinha sido alcançado (62%). Enquanto no sistema convencional em 5 h apenas 40% de hidrólise tinha sido atingido, representando um incremento de 50% no grau de hidrólise e redução de 3 horas no processo global.

A Tabela 5.11 mostra os valores percentuais em ácidos graxos formados no sistema convencional em 8 horas de reação comparando com os valores alcançados no equilíbrio da reação conduzida sob irradiação de ultrassom.

No sistema convencional a lipase de *P. italicum* forneceu graus de hidrólise de 56,05±0,56%, enquanto no sistema acoplado ao banho de ultrassom foi alcançado 79,91±0,45%, o que corresponde a um incremento de 42% na formação de ácidos graxos livres, no mesmo período de tempo de ração (8 h). Esses resultados corroboram com dados reportados por Liu et al., (2008) que verificaram incrementos da ordem 35% na hidrólise de óleos vegetais utilizando lipases comerciais quando o sistema reacional foi acoplado irradiado com ondas ultrassonoras.

Tabela 5.11 - Porcentagem de hidrólise de óleos vegetais mediadas por lipases das espécies selecionadas em diferentes sistemas de aquecimento convencional (8 horas de reação) e ultrassom (tempo para o alcance de máximo grau de hidrólise, marcado entre parênteses).

Lipases	**Grau de hidrólise (%)**		**Aumento na produção AGL (%)**
	Convencional*	Ultrassom	
P. italicum	56,05±0,56	79,91±0,45 (8h)	42
P. janthinellum	56,61±1,81	62,35±0,62 (5h)	12
P. purpurogenum	50,24±0,63	66,77±0,15 (6h)	33

*8 horas de reação
Fonte: Próprio autor

Comparado ao sistema convencional a atuação da lipase de *P. purpurogenum* no sistema irradiado com ondas ultrassonoras propiciou um aumento de 33% na produção de ácidos graxos livres, e redução de 2 horas no processo de hidrólise.

Desta forma a aplicação de ondas sonoras aumentou a velocidade das reações e o grau de hidrólise, demonstrando ser um sistema eficiente na hidrólise de óleos vegetais mediada por lipases ligadas ao micélio. Os óleos de canola e de coco e seus respectivos produtos de hidrólise foram analisados por cromatografia em fase gasosa, gerando os cromatogramas mostrados nos Apêndices C, D e E cujos resultados são apresentados na Tabela 5.12.

Em termos de concentrados de ácidos graxos livres, ambas as lipases espécies *P. italicum e P. janthinellum* foram capazes de enriquecer o meio hidrolisado com ácidos graxos insaturados provenientes do óleo de canola. A lipase da espécie *P. italicum* forneceu 79% de material hidrolisado, desse valor aproximadamente 68% foram ácidos graxos poli-insaturados (C18:1 e C18:2), enquanto a lipase da espécie *P. janthinellum* foi capaz de hidrolisar 63% do óleo de canola, e 53% do material hidrolisado foi composto também pelos mesmos ácidos graxos poli-insaturados. Entretanto, a lipase de espécie *P. italicum* promoveu a maior liberação do ácido oleico (C18:1) para o meio reacional (49%) em relação a lipase de *P. janthinellum* (37%).

Tabela: 5.12- Composição dos concentrados de ácidos graxos obtidos nos hidrolisados dos óleos de canola* e coco** empregando as lipases selecionadas

Lipase	**Grau de hidrólise (%)**	**Ácidos graxos (%)**				
		Láurico C12:0	Mirístico C14:0	Palmítico C16:0	Oleico C18:1	Linoleico C18:2
P. italicum*	79,9±0,5	2,1	0,8	7,8	49,0	13,6
P. janthinellum*	63,5±0,6	1,2	0,7	8,1	37,0	11,9
P. purpurogenum**	66,8±0,2	33,9	14,5	4,7	1,7	0,4

Fonte: Próprio autor

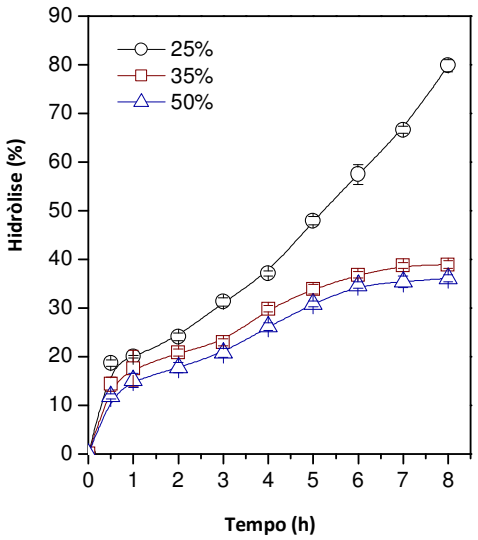
Entre as lipases selecionadas, *P. purpurogenum* forneceu resultado distinto (Apêndice D), tendo hidrolisado preferencialmente ácidos graxos saturados, presentes no óleo de coco. É possível observar que dos 66% dos ácidos graxos liberados por esta lipase 53% são compostos de ácidos graxos saturados (C12:0, C14:0, C16:0), tendo como componente majoritário o ácido láurico (34%) seguido por ácido mirístico com 14% (Tabela 5.12).

5.4.2 Efeito da proporção óleo e água na hidrólise de óleos vegetais

Estudos adicionais foram também efetuados visando verificar a influência da concentração do substrato 25, 35, 50% (m/m) na atuação das lipases das espécies selecionadas seguindo a metodologia proposta no item 4.3.5.1. A razão molar de substratos para uma reação de hidrólise é dada pela quantidade de água e óleo. Uma ativação interfacial é requerida pelas lipases para sua total atividade catalítica. As Figuras 5.11 a 5.13 demonstram que em todas as concentrações de substrato testadas, nesse estudo, houve a produção de ácidos graxos livres, entretanto em todas as reações foram verificadas suscetibilidade das lipases para concentrações de óleo superiores a 25%.

A observação da Figura 5.11 indica que a atuação da lipase de *P. italicum* foi sensivelmente reduzida para concentrações mais elevadas de substrato (35 e 50%). Em elevadas concentrações de óleo a reação de hidrólise é geralmente desfavorecida uma vez que ocorre o fenômeno de coalescência, agrupamento de várias partículas de óleo formando grandes gotas de óleo, o que reduz drasticamente a área da interface e, por conseguinte, a velocidade de reação (CAVALHEIRO, 2013). Este comportamento é comumente reportado na hidrólise de óleos vegetais catalisada por lipases e pode ser também explicado pela inibição por substrato (CHUA et al., 2012).

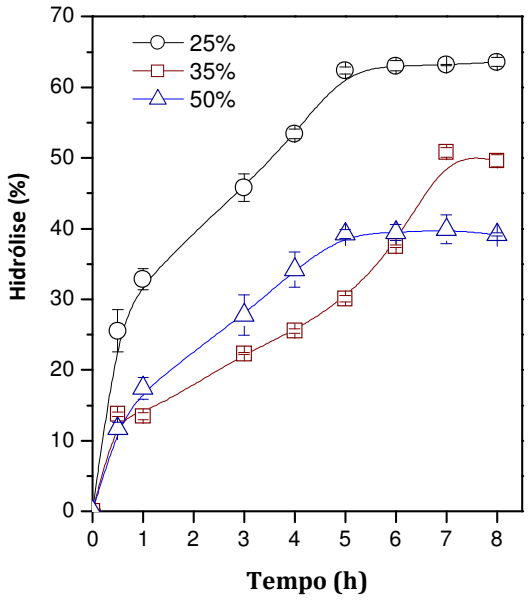
Figura 5.11 - Perfil da hidrólise do óleo de canola para diferentes proporções óleo e água (25%, círculo; 35%, quadrado e 50%, triângulo) conduzida a 40 °C sob irradiação de ultrassom utilizando a lipase de *P. italicum*



Fonte: Próprio autor

Para a lipase da espécie *P. janthinellum* a Figura 5.12 demonstra comportamento similar, ou seja, 25% de óleo foi a concentração na qual houve maior formação de ácidos graxos livres apesar do efeito negativo de concentrações mais elevadas ter sido menos intensa do que a observada para a lipase de *P. italicum.* É possível notar que utilizando 50% (m/m) a saturação do substrato ocorreu em 5 h, obtendo desta forma, 39,15±0,23% de ácidos graxos livres, sendo este valor inferior ao obtido (49,61±0,85% de ácidos graxos livres) quando se utilizou a concentração de 35% (m/m) em 7 h de reação.

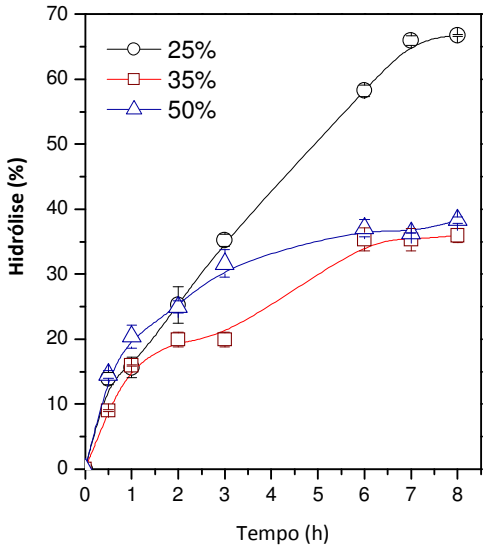
Figura 5.12 - Perfil da hidrólise do óleo de canola para diferentes proporções óleo e água (25%, círculo; 35%, quadrado e 50%, triângulo) conduzida a 40 °C sob irradiação de ultrassom utilizando a lipase de *P. janthinellum.*



Fonte: próprio autor

Analisando a atuação da lipase de *P. purpurogenum* (Figura 5.13) nota-se que quando o meio reacional foi composto por concentrações mais elevadas de substrato (35 e 50%), a velocidade inicial de reação foi afetada inicialmente, entretanto com o progresso da reação foram obtidos valores similares de ácidos graxos livres, correspondendo a grau de hidrólise de 30%.

Figura 5.13 - Perfil da hidrólise do óleo de coco para diferentes proporções óleo e água (25%, círculo; 35%, quadrado e 50%, triângulo) conduzida a 40 °C sob irradiação de ultrassom utilizando a lipase de *P. purpurogenum.*



Fonte: Próprio autor

É possível notar também que cada lipase reagiu de maneira distinta ao efeito da concentração do substrato, obtendo assim, diferentes perfis de hidrólise. Porém, em todas as reações a concentração de 25% forneceu graus de hidrólises mais elevados, ou seja, concentrações elevadas de substrato exerceram efeitos negativos sobre a atividade hidrolítica da enzima.

Cavalcanti-Oliveira et al., (2011) demonstraram que na hidrólise de óleo de soja catalisada por lipase comercial de *Thermomyces lanuginosus* em diferentes concentrações de substrato, essa lipase sofreu o mesmo efeito, para concentrações elevadas de substrato. De fato, a inibição pelo substrato ocorre em diferentes concentrações de substrato dependendo do tipo de enzima, da natureza do óleo e das condições de reação (CHUA et al., 2012).

Assim sendo, uma reação de hidrólise enzimática necessita de dois grandes aspectos: a existência de uma interaface: lipídeo/água e a adsoção da enzima nesta interface. Quanto maior a interface e maior a quantidade de enzima adsorvida maior será a velocidade de reação (CAVALHEIRO, 2013). De maneira geral, há varios registros na literatura indicando que um leve aumento na quantidade de água da reação, ocorre um aumento de atividade devido á melhor conformação enzimática e maior área de interface (CHU; QUEK BAHARIN, 2002; YOU; BAHARIN, 2006).

De uma maneira geral é importante ressaltar que a hidrólise de óleos vegetais utilizando lipases das espécies selecionadas é uma área pouca explorada, sendo estas espécies comumente utilizadas para produção de outras hidrolases, tais como *Penicillium brasilianum, Penicillium echinulatum*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium purpurogenum* (MARJAMAA et al., 2011).

Entretanto, os resultados descritos neste trabalho indicam que as espécies selecionadas do gênero *Penicillium* podem ser consideradas fontes promissoras de lipase ligadas ao micélio, que podem ser aplicadas com relativa eficiência em reações de hidrólise de óleos vegetais saturados ou insaturados, dependendo da espécie. Potenciais aplicações deste procedimento são as reações de hidrólises de óleos vegetais para obtenção de concentrados de ácidos graxos de alto valor agregado (ômega 6), pré-tratamento de efluentes da indústria alimentícia, e uma excelente alternativa na utilização em reações de hidroesterificação para produção de biocombustíveis utilizando matérias-primas de baixa qualidade. Entretanto, estudos adicionais são ainda necessários visando estabelecer para cada matéria-prima lipídica as condições que favorecem o alcance de elevados graus de hidrólise, sendo recomendado, para esse propósito a metodologia de superfície de resposta.

Cabe ainda destacar, que o trabalho experimental descrito neste trabalho foi conduzido empregando lipases ligadas ao micélio na forma livre (biomassa com elevada atividade lipolítica), entretanto, algumas aplicações dessas lipases podem requer o uso na forma imobilizada em suporte adequado, como por exemplo, poliuretano. Esta forma alternativa de biocatalisador pode ser muito útil para condução de reações em reatores de leito fixo operando em fluxo contínuo. Desta forma, experimentos adicionais foram ainda conduzidos visando verificar a potencialidade do uso das lipases selecionadas na forma imobilizada. Os resultados desses testes são apresentados no Apêndice F, que podem servir de base para condução de trabalhos posteriores.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como enfoque selecionar espécies do gênero *Penicilium* para a produção de lipases ligadas ao micélio visando sua posterior utilização na produção de concentrados de ácidos graxos livres a partir de diferentes óleos vegetais. As lipases produzidas foram caracterizadas quanto às propriedades bioquímicas e cinéticas e aplicadas na hidrólise de óleos vegetais contendo diferentes composições em ácidos graxos o que permitiu determinar a especificidade das lipases, em relação aos ácidos graxos. Os resultados obtidos foram altamente satisfatórios e, com base nos dados relatados neste trabalho, concluiu-se que:

- ✓ Dentre as dez espécies do gênero *Penicillium* verificou-se que apenas três demonstraram ser boas produtoras de lipase ligadas ao micélio, apresentando atividades hidrolíticas superiores a 150 U/g, *P. janthinellum* CCT3162 (171,1 U/g); *P. italicum* AT 4421(199,3 U/g); *P. purpurogenum* AT2008 (170,3 U/g);

- ✓ As propriedades bioquímicas e cinéticas das lipases das três lipases selecionadas foram determinadas, obtendo-se valores de *kd* =0,76 h^{-1} (tempo de meia-vida de 0,92 h), *Km*=151,3mM e V_{max}= 539,1 µmol/min para a lipase de *P. italicum* AT 4421. A lipase de *P. janthinellum* CCT3162 revelou valores de 0,62 h^{-1} para *kd* (tempo de meia-vida = 1,17h), e constantes cinéticas (*Km* e V_{max} de 123,6 mM e 387,6 µmol/min, respectivamente). A lipase de *P. purpurogenum* AT2008 forneceu valores de *kd* = 0,57 h^{-1} (tempo de meia-vida= 1,21h) e parâmetros cinéticos (*Km*= 141,4 mM e V_{max}= 493,9 µmol/min). Com relação aos valores ótimos de temperatura e pH, as três lipases demonstraram atividades mais elevadas a 40 ºC e pH 7.

- ✓ Utilizando diferentes óleos vegetais verificou-se maior especificidade das lipases de *P. italicum* AT4421 e *P. janthinellum* CCT3162 para o óleo de canola rico em ácido oleico e da lipase de *P. purpurogenum* AT2008 para óleo de coco com composição majoritária em ácido láurico.

✓ A utilização da irradiação de ondas ultrassonoras aumentou a velocidade de reação e favoreceu a obtenção de elevados graus de hidrólise. Para a lipase de *P. italicum* AT4421 houve um aumento de 42%, para lipase de *P. janthinellum* CCT3162 foi constatado um incremento de 12% e para a lipase de *P. purpurogenum* AT2008 o aumento foi da ordem de 33%, nas condições fixas de (pH 7, temperatura de 40 ºC, 300 rpm, 25% (m/m) de substrato, 410U/g). Concentrações mais elevadas de substrato (> 25% de óleo) afetaram negativamente atuação de todas as lipases testadas.

✓ Os resultados obtidos por cromatografia gasosa do material hidrolisado sugerem que as lipases das três espécies selecionadas foram capazes de enriquecer o meio com ácidos graxos obedecendo a composição de suas respectivas matérias-primas lipídicas. Para as lipases de *P. italicum* e *P. janthinellum* utilizando o óleo de canola, os ácidos graxos liberados foram basicamente insaturados, sendo que aproximadamente 50% desse material era composto por ácido oleico (C18:1), demonstrando assim, a aplicabilidade destas lipases para produção de ácidos graxos essenciais, os quais possuem alto valor agregado. Para a espécie *P. purpurogenum* utilizando o óleo de coco o hidrolisado gerado foi composto basicamente de ácidos graxos saturados, possuindo aproximadamente 50% de ácido láurico (C12:0), podendo ser utilizado como matéria-prima em indústrias de cosméticos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinar as condições ótimas para alcançar um máximo rendimento nas reações de hidrólise acopladas ao banho ultrassônico e estabelecer um modelo matemático que correlacione as respostas obtidas com as variáveis significativas do processo, empregando metodologia de superfície de resposta;

- Utilização das lipases das espécies selecionadas *P. janthinellum* CCT3162, e *P. purpurogenum* AT2008 imobilizadas em espumas de poliuretano, e *P. italicum* AT 4421 imobilizada em manta de fibra de carbono, em reatores contínuos acoplados a um banho ultrassônico, para a hidrólise de óleos vegetais.

REFERÊNCIAS

AARTHY, M.; SARAVANAN, P.; GOWTHAMAN, M. K.; KAMINI, N. R. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: an overview. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, p.1591-1601, 2014.

ABBAS, C. A.; GROVES S.; GANDER J. E. Isolation, purification, and properties of *Penicillium charlesii* alkaline protease. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 10, p. 5630-5637, 1989.

ADINARAYANA, K.; BAPI RAJU, K. V. V. S. N.; ZARGAR, M. I.; DEVI, R. B.; LAKSHMI, P. J.; ELLAIAH, P. Optimization of process parameters for production of lipase in solid-state fermentation by newly isolated *Aspergillus* species. **Industrial Journal of Biotechnology,** v3, p. 65-69, 2004.

ADULKAR, T. V.; RATHOD V. K. Ultrasound assisted enzymatic pre-treatment of high fat content dairy wastewater. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, p. 1083-1089, 2014.

ADSUL, M. G.; ASAWARI, P. T.; VARMA, A. J.; GOHKALE, D. V. Cellulases from *Penicillium janthinellum* mutants: solid-state production and their stability in ionic liquids, **BioResources,** v. 4, p. 1670-1681, 2009.

AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; CASTRO, A.M; LANGONE M.A.P; FREIRE, D. M. G. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315-321, 2014

AKORTA, I.; GARBISU C.; LLAMA M. J.; SERRA J. L. Immobilization of pectin lyase from *Penicillium italicum* by covalent binding to nylon. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 141-146, 1996.

ANDRADE, G.S.S.; FREITAS, L.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Screening, immobilization and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolysis of babassu oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 84, p. 183– 188, 2012.

ANDRADE, G.S.S.; CARVALHO, A.K.F.; ROMERO, C.M.; OLIVEIRA, P.C.; DE CASTRO, H.F. *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyl esters based on babassu oil. **Bioprocess and Biosystem Engineering**, v. 37, p. 2539–2548, 2014.

ANTCZAK, M. S.; ANTCZAK, T.; RZYSKA, M.; BIELECKI, S. Catalytic properties of membrane-bound *Mucor* lipase immobilized in a hydrophilic carrier. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 261–268, 2002.

ANTCZAK, M. S.; ANTCZAK, T.; RZYSKA, M.; MODRZEJEWSKA, Z.; PATURA, J.; KALINOWSKA, H.; BIELECKI, S. Stabilization of an intracellular *Mucor circinelloides* lipase for application in non-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 29, p. 163-171, 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists,** Washington 15th ed., p.369-406, 1990.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**: preparation of Methyl Esters of Fatty Acids Ce 2-66, 5 th ed. Champaign, 2003.

AVELAR, M. H. M.; CASSIMIRO D. M. J.; SANTOS K. C.; DOMINGUES R. C. C.; DE CASTRO H. F.; MENDES A. A. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. **Industrial Crops and Products**, v.44, p.452-438, 2013.

AVISHA, Z.; DEBARATI, M.; DIPA, B. Biolubricat synthesis from waste cooking oil via enzymatic hydrolysis followed by chemical esterification. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, p. 139-144, 2012.

BAIN & COMPANY, **Potencial da diversificação da indústria química Brasileira: Relatório 3-Oleoquímicos**, Rio de Janeiro: BAIN & COMPANY, 2014.

BAN, K.; KAIEDA M.; MATSUMOTO T.; KONDO A.; FUKUDA H. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v.8, p. 39-43, 2001.

BANCERZ, R.; GINALSKA G.; FIEDUREK J.; GROMADA A. Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotrophic fungus *Penicillium chrysogenum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 253–260, 2005.

BARREIRO, C.; MARTÍN J. F.; GARCÍA-ESTRADA C. Proteomics shows new faces for the old penicillin producer *Penicillium chrysogenum.* **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p.15, 2012.

BABICZ, I. **Produção de diacilgliceróis via hidrólise enzimática do óleo de palma**. 95 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

BELANCIC, A.; SCARPA, J.; PEIRANO, A.; DÍAZ, R.; STEINER, J.; EYZAGUIRRE, J. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes. **Journal of Biotechnology**, v.41, p.71-79, 1995.

BHARATHIRAJA, B.; CHAKRAVARTHY, M.; RANJITH KUMAR, R.; YUVARAJ, D.; JAYAMUTHUNAGAI, J.; PRAVEEN KUMAR, R.; PALANI, S. Biodiesel production using chemical and biological methods: A review of process, catalyst, acyl acceptor, source and process variables. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.38, p. 368–382, 2014.

BLACKWELL, M.; SPATAFORA, J.M. Fungi and their Allies. In: MUELLER, G.M; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S, **Biodiversity of Fungi**: inventory and monitoring methods, San Diego, California, USA: Elsevier Academic Press, 2004, v.1, p. 09-18.

BON, E. P.S; PEREIRA JR, N.; GOTTSCHALK L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J.C.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para a produção de enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A; CORVO, M. L; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. **Enzimas em Biotecnologia**: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro. Interciência**,** 2008, v.1, p. 95-116.

CALDER, P.C. Marine omega-3 fatty acids and inflammation. **Journal of Lipid Nutrition,** v.19, 2010.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D'A; DA SILVA, P. R.; RAMOS, A. P.; ARANDA, D. A. G.; FREIRE D. M. G. Study of soybean oil hydrolysis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase and its application to biodiesel production via hydroesterification. **Enzyme Research**, v. 2011.

CAVALHEIRO J. C**. Hidrólise de óleo de canola catalisada por mistura de lipases imobilizadas**, 2013, Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CHAHINIAN, H.; VANOT, G.; IBRIK, 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**, v. 64, p. 215-222, 2000.

CHÁVEZ, R.; NAVARRO C.; CALDERÓN I.; PEIRANO A.; BULL P.; EYZAGUIRRE J. Secretion of endoxylanase A from *Penicillium purpurogenum* by *Sacharomyces cerevisae* transformed with genomic fungal DNA. **FEMS Microbiology Letter**, v. 212, p. 237-241, 2002.

CHINAGLIA, S.; CHIARELLI L. R.; MAGGI M.; RODOLFI M.; VALENTINI G.; PICCO A. M. Biochemistry of lipolytic enzymes secreted by *Penicillium solitum* and *Cladosporium cladosporioides*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.78, p.245-254, 2014.

CHU, B. S.; QUEK, S. Y.; BAHARIN B. S. Optimisation of enzymatic hydrolysis for concentration of vitamin E in palm fatty acid distillate. **Food Chemistry**, v.80, p. 295-302, 2003.

CHUA; L. S., ALITABARIMANSOR, M.; LEE, C. T.; MAT, R. Hydrolysis of virgin coconut oil using immobilized lipase in a batch reactor. **Enzyme Research**, v. 2012, doi: 10.1155/2012/542589.

COSTA, M. A. F.; PERALTA R. M. Production of lipase by soil fungi and partial characterization of lipase from a selected strain (*Penicillium wortmanii*). **Journal of Basic Microbiology**, v. 39, p. 11–15, 1999.

DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; FREITAS, L; SANTOS, J. C. Modificação enzimática de óleos e gorduras para a obtenção de biocombustíveis e produtos de interesse do setor alimentício. In: MARSAIOLI, A. J.; PORTO, A. L. M, **Biocatálise e biotransformação:** fundamentos e aplicação. Salto: Schoba, v. 1, p. 275-3 17, 2010.

DE SOUSA, J. S.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; ARANDA, D. A. G.; FREIRE, D. M. G. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.65, p.133–137, 2010.

DHEEMAN, D.S; ANTONY-BABU, S.; FRIAS, J.M; HENEHAN, G. T. M. Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain *Penicillium* sp DS-39 (DSM 23773). **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 72, p. 256–262, 2011.

DOBREV, G.; ZHEKOVA B.; DOBREVA V.; STRINSKA H.; DOYKINA P.; KRASTANOV A. Lipase biosynthesis by *Aspergilus carbonarius* in a nutrient medium containing products. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, n.4, p.77-82, 2015.

EITENMILLER, R. R.; VAKIL, J. R.; SHAHANI, K.M. Production and properties of *Penicillium roqueforti* lipase. **Journal of Food Science**, v. 35, p.130-33, 1970.

FABER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry**, 6th ed., Heidelberg: Springer-Verlag, 2011.

FEDOSOV, S.N.; BRASK, J.; PEDERSEN, A.K.; NORDBLAD, M.; WOODLEY, J.M.; XU, X. Kinetic model of biodiesel production using immobilized lipase *Candida antarctica* lipase B. **Journal of Molecular Catalisys B: Enzymatic**, v.85–86, p.156–168, 2013.

FEITEN, M. C.; ROSA, C. D.; TREICHEL, H.; FURIGO JR., A., ZENEVICZ, M. C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Batch and fed-batch enzymatic hydrolysis of soybean oil under ultrasound irradiation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology,** v.3, p. 83–85, 2014.

FERRER, M.; PLOU, F. J.; NUERO, O. M.; REYES, F.; BALLESTEROS, A. Purifications and properties of a lipase form *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 75, p.569-576, 2000.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova,** v.28, p.871-879, 2005.

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

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATIONS. **GRAS Notification for Lipase derived from *Penicillium camemberti***, Law Offices Keller and Heckman, Washington DC, USA, 2001.

FREITAS, L.; BUENO, T.; PÉREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Produção de ácidos graxos poli-insaturados por via enzimática: revisão dos princípios tecnológicos do processo parte 2: importantes aspectos da alternativa biotecnológica. **Ciência e Cultura**, v.1, p. 50-59, 2006.

FROST, G. M.; MOSS, D.A., Production of enzymes by fermentation. In: REHM H.-J.; REED, G., **Biotechnology**, Weinheim, Alemanha, Verlagsgesellschaft (VCH), 1987, v. 7a, 75-80.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, p. 2–12, 2009.

GAN, Q.; BAYKARA, F.; RAHMAT, H.; WEATHERLEY, L.R. Analysis of a direct contact membrane reactor for lipase catalysed oil hydrolysis in a dynamic emulsion system. **Catalysis Today**, v. 56, n.1-3, p. 179-190, 2000.

GAO, J.; SHI L.; JIANG Y.; ZHOU L.; HE Y. Formation of lipase *Candida* sp. 99-125 CLEAs in mesoporous silica: characterization and catalytic properties. **Catalysis Science and Technology**, v.3, p. 3353, 2013.

GARCIA-GALAN, C.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; TORRES, R.; RODRIGUES, R. C. FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Biotechnological prospects of the lipase from *Mucor javanicus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 93, p. 34-43, 2013.

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

GLÜCK, T.; ALTER P. Marine omega-3 highly unsaturated fatty acids: from mechanisms to clinical implications in heart failure and arrhythmias. **Vascular Pharmacology**, 2016.

GHOSH, P.K; SAXENA, R.K; GUPTA, R.; YADAV, R.P.; DAVIDSON, S. Microbial lipases: production and applications. **Science Progress**, v.79, n. 2, p.119-157, 1996.

GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p.1-21, 2011.

GUPTA, R.; KUMARI, A.; SYAL, P.; SINGH, Y. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology **Progress in Lipid Research**. v. 57, p. 40-54, 2015.

GUTARRA, M.L.E.; CAVALCANTI, E.D.C.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D. M. G.; SANT' ANNA JR., G.L. Lipase production by solid-state fermentation: Cultivation conditions and operation of tray and packed-bed bioreactors. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 121, p. 105–116, 2005.

HALDANE, J.B.S. **Enzymes.** London: Longmans, Green and Co, 1930.

HASHEM, A.M. Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced by *Penicillium oxalicum.* **Bioresource Technology**, v.75, p.219-222, 2000.

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

HIDALGO, M.; STEINER, J.; EYZAGUIRRE, J. Beta-glucosidase from *Penicillium purpurogenum*: purification and properties. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 15, p. 185–191, 1992.

HIOL, A.; JONZO, M. D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme Microbial and Technology,** v. 26, p.421–30, 2000.

HURST, S.; ZAINAL, Z.; CATERSON, B.; HUGHES, C.E.; HARWOOD, J.L. Dietary fatty acids and arthritis. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 82, p. 315-318, 2010.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Fleming´s penicillin-producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens.* **Ima Fungus**, v.2, p. 87-95, 2011.

ISOBE, K.; AUMANN, K-L; SCHMID, R.D. A structural model of mono- and diacylglycerol lipase from *Penicilliurn camemberti*. **Journal of Biotechnology**, v.32 p.83-88, 1994.

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

JIANG, X.; CHANG, M.; WAMG, X.; JIN, Q.; WANG, X. The effect of ultrasound on enzymatic degumming process of rapeseed oil by the use of phospholipase A1. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.21, 142–148, 2014.

JO, J. C.; KIM H. K. Production of cinnamoyl lipids using immobilized *Proteus vulgaris* K80 lipase and an evaluation of their antioxidant activity **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 129, p. 54-60, 2016.

KARANAM, S. K.; MEDICHERLA, N. R. Enhanced lipase production by mutation induced *Aspergillus japonicas*. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 2064-2067, 2008.

KASHMIRI, M. A.; ADNAN, A.; BUTT, B. W. Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma viride*. **African Journal of Biotechnology**, v.5, p.878-882, 2006.

KHASKHELI, A. A.; TALPUR, F. N.; ASHRAF, M. A.; CEBECI, A.; JAWAID, S., AFRIDI H, I. Monitoring the *Rhizopus oryzae* lipase catalyzed hydrolysis of castor oil by ATR-FTIR spectroscopy. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.113, p.56–61, 2015.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T., Biotechnology: a multi volume comprehensive treatise. In: REHM, H.J.; REED, G.; PÜHLER, A.; STADLER, P.J.W. **Biotransformations I**. Weinheim: Wiley-VCH, 1998, v.8, cap 3.

KEMPKA, A. P.; LIPKE, N.L.; PINHEIRO, T. L. F.; MENONCIN, S.; TREICHEL, H.; FREIRE D. M. G.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D. Response surface method to optimize the production and characterization of lipases from *Penicillium verruscosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.31, p.119-125, 2008.

KUMARI, A.; GUPTA, R. Purification and biochemical characterization of a novel magnesium dependent lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54 and its application in biodiesel production. **Asian Journal of Biotechnology**, v.4, p.70–82, 2012.

KURTOVIC, I.; MARSHALL, S. N.; CLEAVER, H. L.; MILLER, M. R. The use of immobilised digestive lipase from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) to generate flavour compounds in milk. **Food Chemistry**, v.199, p. 321-329, 2016.

KOSHLAND, D. E.; NEET, K. E. The catalytic and regulatory properties of enzyme. **Biochemistry**, v. 37, p. 359-411, 1968.

LABOUREUR, P.; LABROUSSE, M. Isolation, purification and properties of the lipase of *Rhizopus arrhizus* var. *delemar*. **Bulletin de la Societe de Chimic Biologique**, v. 48, p.747-769, 1966.

LAMBERET, G.; MENASSA, A. Purification and properties of an acid lipase from *Penicillium roqueforti.* **Journal Dairy Research**, v.50, p.459-468, 1983.

LE DRÉAN, G.; MOUNIER, J.; VASSEUR, V.; ARZUR, D.; HABRYLO, O.; BARBIER, G. Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.138, p.100–107, 2010.

LEITE R. S. R. **Aplicação das β-glicosidases produzidas pelos microrganismos *Aureobasidium pullans* e *Thermoascus auantiacus* em derivados de soja, sucos e bebidas e estudos cristalográficos das enzimas**, 2007, 80f, Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), São José do Rio Preto.

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

LI, D.; QIN, X.; WANG, J.; YANG, B.; WANG, W.; HUANG, W. Hydrolysis of soybean oil to produce diacylglycerol by a lipase from *Rhizopus oryzae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.115, p.43-50, 2015.

LIAO, H.; FAN, X.; MEI, X.; WEI, Z.; RAZA, W.; SHEN, Q.; XU, Y. Production and characterization of cellulolytic enzyme from *Penicillium oxalicum* GZ-2 and its applications in lignocellulose saccharification. **Biomass and Bioenergy**, v.74, p.122-134, 2015.

LIU, Y.: JIN, Q.: SHAN, L.: LIU, Y.: SHEN, W.: WANG, X. The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solventfree system. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.5, p.402–407, 2008.

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

LIMA, R. C.; SILVA, H. N. L.; PINOTTI, L. M. Produção de lipases por *Penicillium* sp. p. 679-682. In: São Paulo: Blucher, 2014. ISSN 2359-1757, DOI 10.5151/chemeng-cobec-ic-07-eb-138.

GUO, H.; ZHOU, Q.; WANG, J.; LIN, B.; ZHANG, H.; GAO, Z.; XIA, C.; ZHO, X. Highly efficient enzymatic preparation for dimethyl carbonate catalyzed by lipase from *Penicillium expansum* immobilized on CMC–PVA film. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.96, p.96– 102, 2013.

LOCK, L. L.; CORBELINI, V. A.; VALENTE, P. Lipases produced by yeasts: powerful biocatalysts for industrial purposes. **Tecno-Lógica**, v.11, p.18-25. 2007.

MACHADO, G. D.; SOUZA, T. L.; ARANDA, D. A. G.; PESSOA, F. L. P.; CASTIER, M.; CABRAL, V. F.; CARDOZO-FILHO, L. Computer simulation of biodiesel production by hydro-esterification. **Chemical Engineering and Processing**, v.103, p.37–45, 2016.

MAKHSUMKHANOVA, A.; YAKUBOV I.T.; DAVRANOV, K. Conditions for cultivation of the fungus *Penicillium melinii* UzLM-4 and its biosynthesis of lipases. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v.39, p.40–43, 2003.

MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL JR, C. G.; AMUNDSON, C. H. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.67, n.12, p. 890- 910, 1990.

MALMSTROM, J.; CHRISTOPHERSEN, C.; FRISVAD, J. C. Secundary metabolites characteristic of *Penicillinium citrinum, Penicillium steckii* and related species, **Phitochemistry**, v. 54, p. 301-309, 2000.

MARJAMAA, K.; TOTH, K.; BROMANN, P. A.; SZAKACS, G.; KRUUS, K. Novel *Penicillium* cellulases for total hydrolysis of lignocellulosics. **Enzyme and Microbial Technology**, v.52, p.358–369, 2013.

MARKETS AND BUSINESS, **Biocatalysis and biocatalysts market to reach 111,940 tonnes by 2019,** Focus on Catalysts**,** v. 2015, p. 2, 2015**.**

MARTINELLE, M.; HULT, K., Kinect of triacyl glycerol lipases, PETERSEN, S. B.; WOOLEY, P., **Lipases**: their structure, biochemistry and application, Cambridge University Press, 1994.

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

MENDES, A. A.; FREITAS, L.; CARVALHO, A.K.; OLIVEIRA, P.C.; DE CASTRO, H.F. Immobilization of a commercial lipase from *Penicillium camembertii* (lipase G) by different strategies. **Enzyme Research**, v.2011, p. 1-8, 2011.

MENG, Y.; WANG, G.; YANG, N.; ZHOU, Z.; LIANG, X.; CHEN, J.; LI, Y.; LI, J. Two-step synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase. **Biotechnology for Biofuels**, v.4, p.1-9, 2011.

MOBARAK-QAMSARI, E.; KASRA-KERMANSHAHI, R.; NOSRATI, M.; AMANI, T. Enzymatic pre-hydrolysis of high fat content dairy wastewater as a pretreatment for anaerobic digestion. **International Journal of Environmental Research**, v. 6, p. 475-480, 2012.

NDAGIJIMANA, M.; CHAVES-LÓPEZ, C.; CORSETTI, A.; TOFALO, R.; SERGI, B.; PAPARELLA, A.; GUERZONI, M. E.; SUZZI, G. Growth and metabolites production by *Penicillium brevicompactum* in yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**, v.127, p.276–283, 2008.

NOOR, I.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K. B. Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by lipase. **Process Biochemistry**, v.39, p. 13-20, 2003.

NOVOZYMES. **The Novozymes Report 2014**, 2014.

NORONHA, I. L.; OLIVEIRA, A.C.; ARAÚJO, M. R. T.; ABENSUR, H.; QUINTAES, S. L.; GENZINI, T.; PEROSA, M.; CAMPAGNARI, J. C.; MARCONDES, M.; ROMÃO, JR. J. E. *Micofenolato mofetil* (MMF) em transplante de órgãos. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.19, n.4, p.398-406, 1997.

ONIONS, A. H. S.; BRADY, B. L. Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium.* In: PEBERDY, J.F. **Biotechnology handbooks**: *Penicillium* and *Acremonium*. England. London: Plenum Press, 1987, v.1, p. 262-265.

PADILHA, M. E. S.; AUGUSTO-RUIZ, M. Fatty acid isolation by crystallization of fish oil fractioned by enzymatic hydrolysis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, 2009. doi:10.1590/S0101.

PIMENTA, R. S.; SILVA, F. L.; SILVA, J. F. M.; MORAIS, P. B.; BRAGA, D. T.; ROSA, C. A.; CORRÊA JR. A. Biological control of *Penicillium italicum, P. digitatum* and, *P. expansum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis schoenii* on orange. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.85-90, 2008.

PIMENTEL, M. C.; KRIEGER, N.; COELHO, L. C.; FONTANA, J.O.; MELO, E. H.; LEDINGHAM, W. M.; LIMA FILHO, J. L. Lipase from a Brazilian strain of *Penicillium citrinum.* **Applied Biochemical and Biotechnology**, v.1, p.59-74, 1994.

POUDEROYEN, G. V.; EGGERT, T.; JAEGER, K-E.; DIJKSTRA, B. W. The crystal structure of *Bacillus subtili* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, p. 215-226, 2001.

POURZOLFAGHAR, H.; ABNISA, F.; DAUD, W. M. A. W.; AROUA, M. K. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.61, p.245-257, 2016.

PURWANTO, M. G. M.; MARETHA, M.V.; WAHYUDI, M.; GOELTOM, M.T. Whole cell hydrolysis of sardine (*Sardinella lemuru*) oil waste using *Mucor circinelloides* NRRL 1405 Immobilized in poly-urethane foam. **Procedia Chemistry,** v.14, p.256 – 262, 2015.

RAJESH, E. M.; ARTHE, R.; RAJENDRAN, R.; BALAKUMAR, C.; PRADEEPA, N., ANITHA, S. Investigation of lipase production by *Trichoderma reesei* and optimization of production parameters. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, p. 1177-1189, 2010.

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

RAMKUMAR, S.; KIRUBAKARAN, V. Biodiesel from vegetable oil as alternate fuel for C.I engine and feasibility study of thermal cracking: A critical review. **Energy Conversion and Management**, v.118, p.155–169, 2016.

RIBEIRO, B. D.; DE CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, v.2011, p.1-17, 2011.

RICO, A. L. L**. Produção enzimática de biodiesel etílico em reator de leito fixo e regime de fluxo contínuo utilizando células íntegras de *Mucor circinelloides* imobilizadas em espuma de poliuretano**, 2015, Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo.

RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L. L.; ROSSI, A. V.; SCHUCHARDT, U. Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Química Nova***,* v. 30, p.1374-1380, 2007.

ROONEY, D.; WEATHERLEY, L. R. The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid–liquid reactor. **Process Biochemistry**, v.36, p.947–953, 2001.

SALIHU, A.; ZAHANGIR A. M. Solvent tolerant lipases: A Review. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 86-96, 2015.

SHUKLA, P.; GUPTA, K. Ecological screening for lipolytic molds and process optimization for lipase production from *Rhizopus oryzae* KG-5. **Journal of Applied Science Environmental Sanitary***,* v.2, p.35–42, 2007.

SIVARAMAKRISHNAN, R.; INCHAROENSAKDI, A. Purification and characterization of solvent tolerant lipase from *Bacillus sp*. for methyl ester production from algal oil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 5, p.517-522, 2016.

SONG, T-J.; CHANG, Y.; SHIN, M-J.; HEO, J. H.; KIM, Y-J. Low levels of plasma omega 3-polyunsaturated fatty acids are associated with cerebral small vessel diseases in acute ischemic stroke patients. **Nutrition Research,** p. 368-374, 2015.

SOOCH, B. S.; KAULDHAR, B. S. Influence of multiple bioprocess parameters on production of lipase from *Pseudomonas* sp. BWS-5. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 56:711-721, 2013.

SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y.; TAKADA, N.; NAGAO, T.; TOMINAGA, Y. *Penicillium abeanum* lipase: purification, characterization, and its use for docosahexaenoic acid enrichment of tuna oil. **Journal Fermentation and Bioengineering**, v. 82, pp. 498–501, 1996.

TALUKDER, M. M. R.; WU, J. C.; FEN, N. M.; MELISSA, Y. L. S. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. **Biochemical Engineering Journal**, v.47, p. 207-212, 2009.

TALUKDER, M. M. R.; DAS, P.; FANG, T.S.; WU, J.C. Enhanced enzymatic transesterification of palm oil to biodiesel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, p.119–122, 2011.

TAO, N.; JIA, L.; ZHOU, H. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum.* **Food Chemistry**, 153:265-271, 2014.

TORRES, M.; DOLCET, M.M.; SALA, N.; CANELA, R. Endophytic fungi associated with mediterranean plants as a source of mycelium-bound lipases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.3328-3333, 2003.

UNKEFER, J.C.; JACKSON, C.; GANDER J. E. The 5-O-β-$_{D}$-Galactofuranosyl-containing glycopeptide from *Penicillium charlesii.* **The Journal of Biological Chemistry**. v. 257, n. 5, pp. 2491-2497, 1982.

VARDANEGA, R.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; POLLONI, A.; RIGO, E.; NINOW, L. N.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M.A. Systematic study on extraction of lipase obtained by solid-state fermentation of soybean meal by a newly isolated strain of *Penicillium* sp. **Food Process Technology,** v.3, p.461-465, 2010.

VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; HONG, S.-B; KLAASSEN, C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R. A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v.78, p.343–371, 2014.

WISEMAN, Alan. **Handbook of enzymes**. 3 rd edition. London: Ellis Horwood Limited, 1995.

XIAO, M.; MATHEW S.; OBBARD J. P. A newly isolated fungal strain used as whole-cell biocatalyst for biodiesel production from palm oil. **Global Change Biology Bioenergy**, v.2, p.45-51, 2010.

XU, Y.; WANG, D.; MU, X. Q.; ZHAO, G. A.; ZHANG, K. Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinesis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 18, p. 1–3, 2002.

YADAV, R.P.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, S. Lipase production by *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Folia Microbiology**, v. 43, p. 373–378, 1998.

YADAV, S.; YADAV, P. K.; YADAV, D.; YADAV, K. D. S. Pectin lyase: a review. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1-10, 2009.

YAMAGUCHI, S.; MASE, T. Purification and characterization of mono- and diacylglycerol lipase isolated from *Penicillium camembertii* U-150. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.34, p. 720–725, 1992.

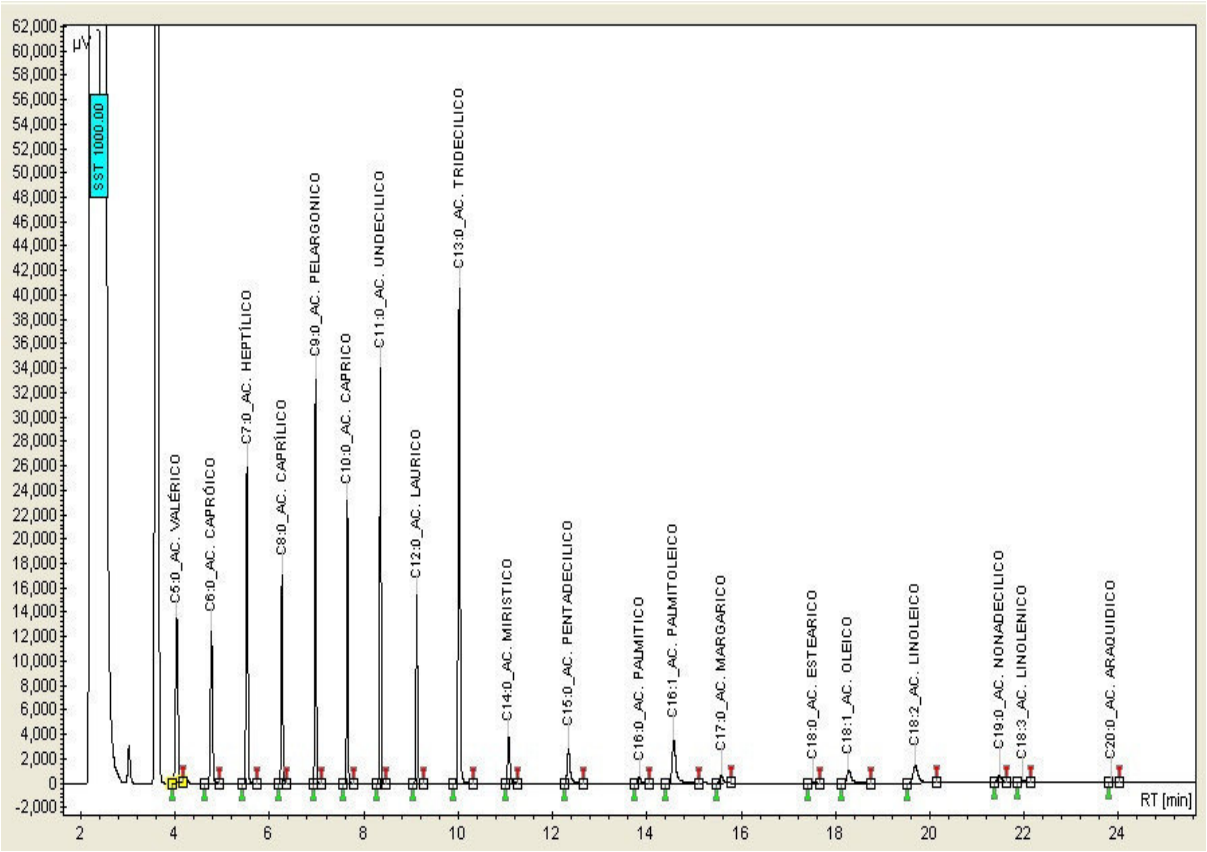
YAMAGUCHI, S.; MASE, T.; TAKEUCHI, K. Secretion of mono- and diacylglycerol lipase from *Penicillium camembertii* U-150 by *Saccharomyces cerevisiae* and site-directed mutagenesis of the putative catalytic sites of the lipase. **Bioscience Biotechnology Biochemical**, v.56, p. 315–319, 1992.

YOSHIDA, A.; HAMA, S.; TAMADANI, N.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Improved performance of a packed-bed reactor for biodiesel production trough whole-cell biocatalysis employing a high-lipase-expression system. **Biochemical Engineering Journal,** v. 63, 76-80, 2012.

YOU, L. L.; BAHARIN, B. S., Effects of enzymatic hydrolysis on crude palm olein by lipase from *Candida rugosa*, **Journal of Food Lipids**, v.13, p. 73-87, 2006.

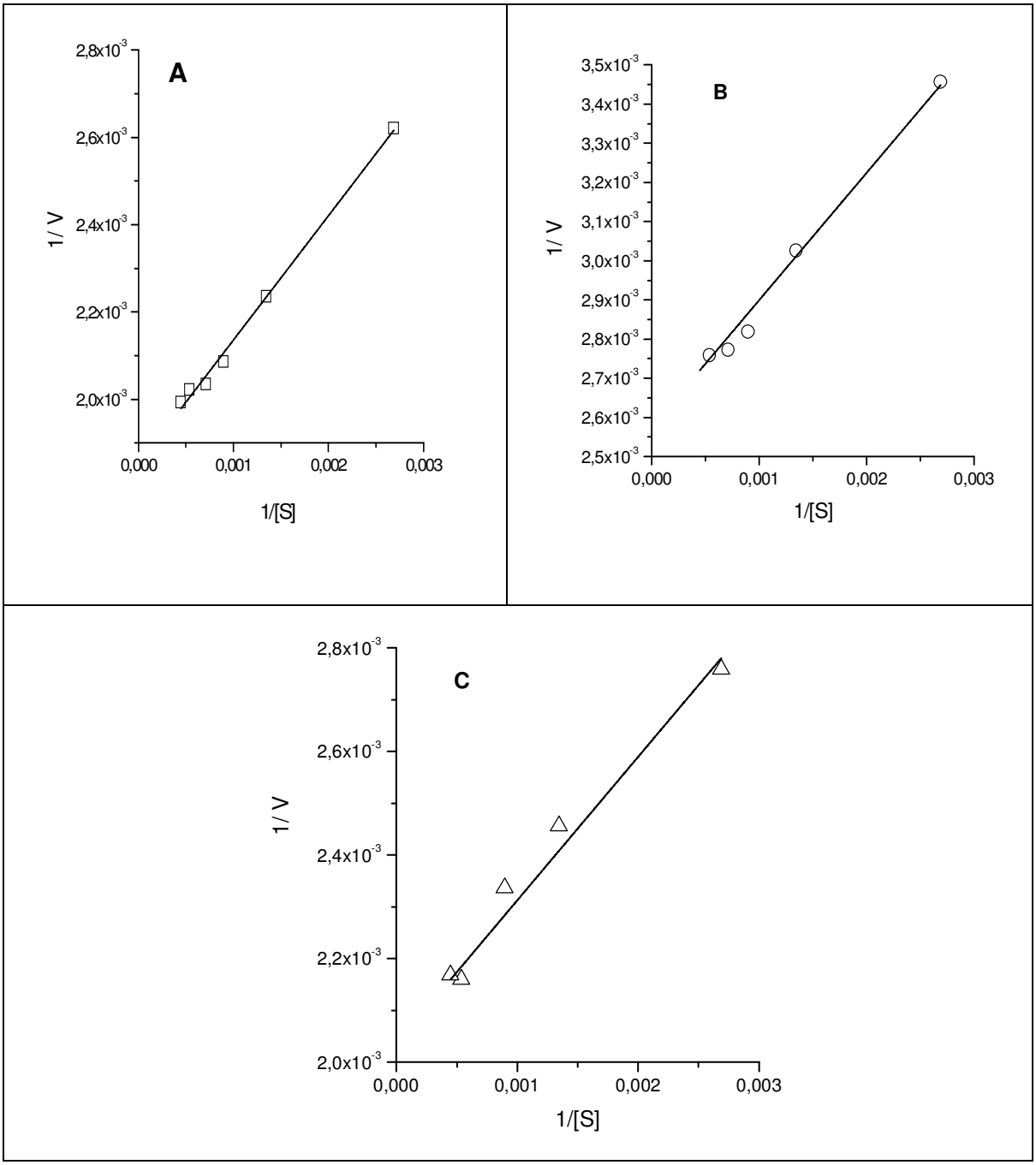
APÊNDICES

APÊNDICE A: Cromatograma gerado na análise dos padrões cromatográficos SIGMA

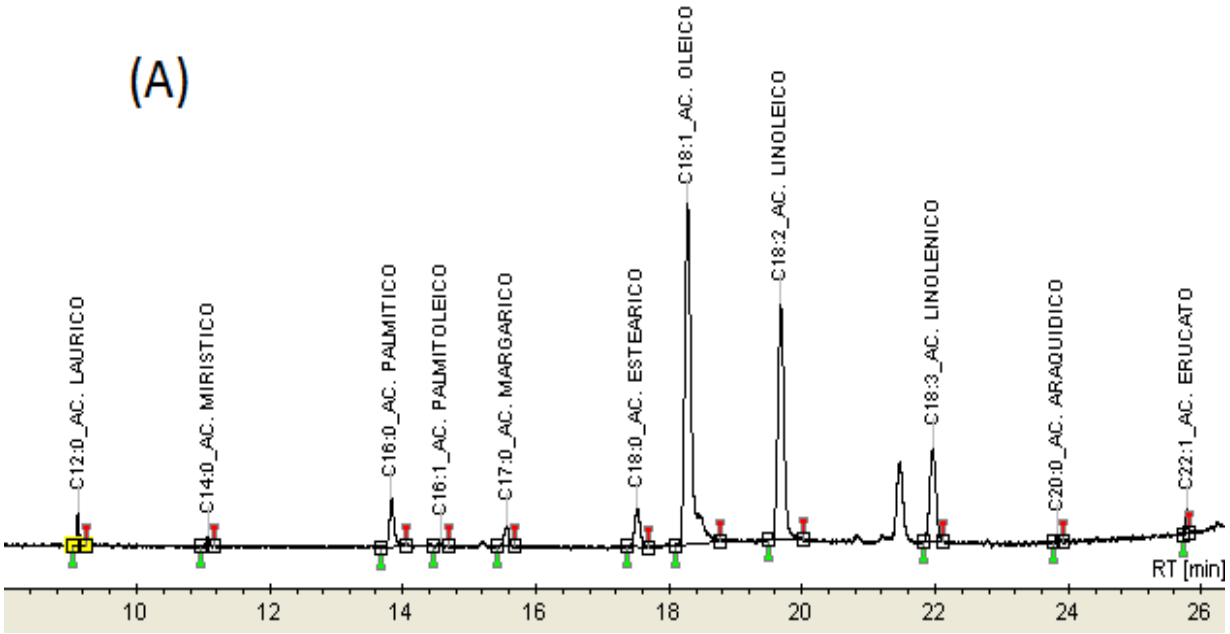


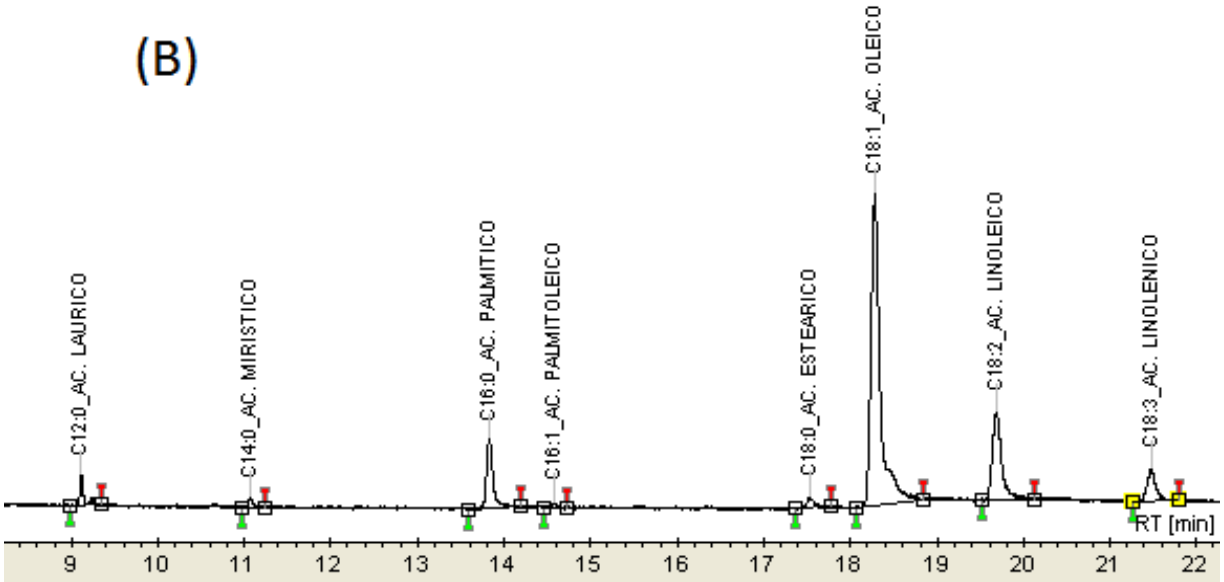
APÊNDICE B: Determinação dos Parâmetros Cinéticos – Modelo de Lineweaver-Burk

Gráficos de linearização dos parâmetros cinéticos para as lipases de *P. italicum* (A); *P. janthinellum* (B) *e P. purpurogenum* (C)



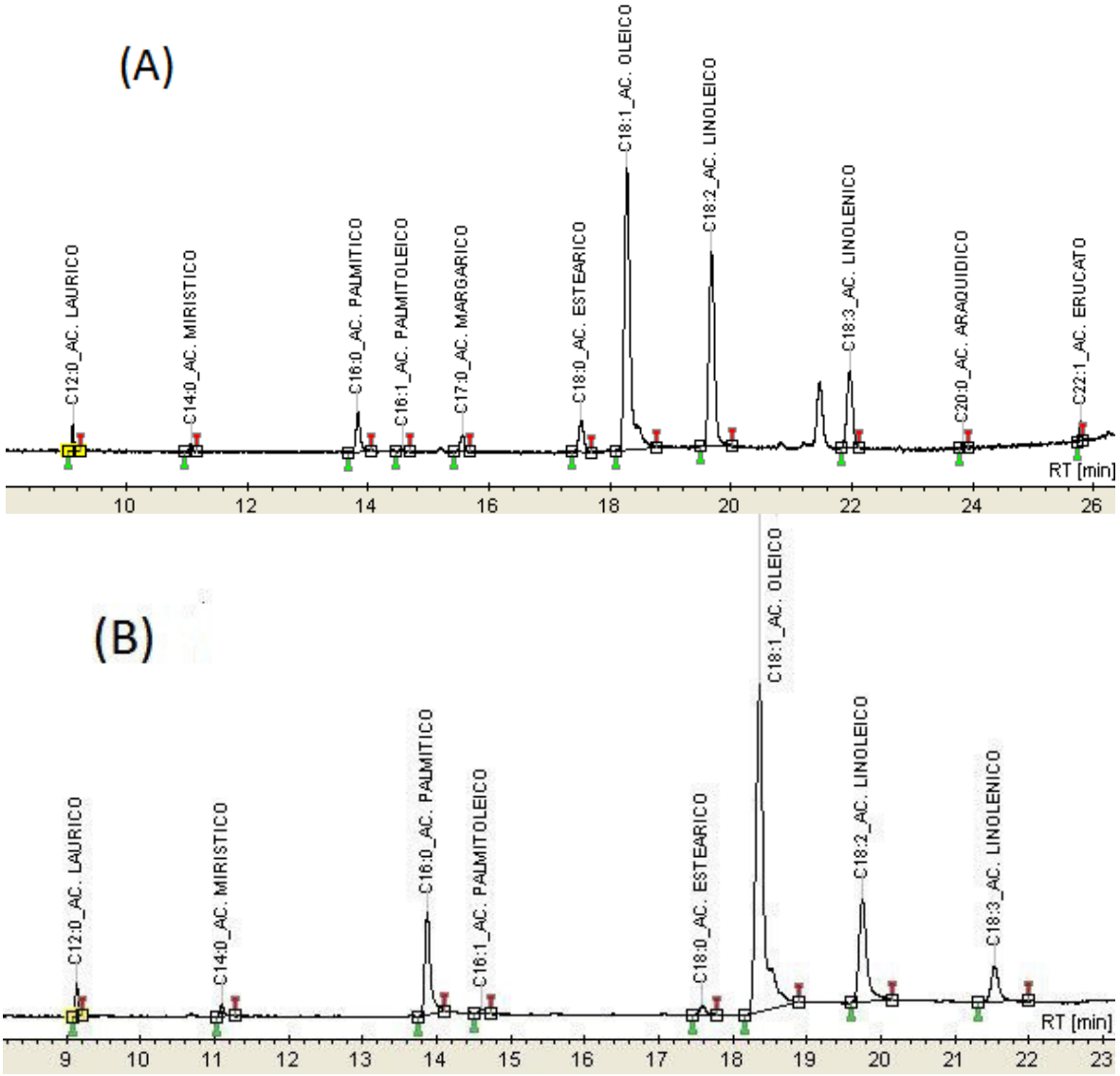
APÊNDICE C: Cromatogramas gerados nas análises do óleo de canola (A) e do hidrolisado obtido pela atuação da lipase de *P. italicum* (B)





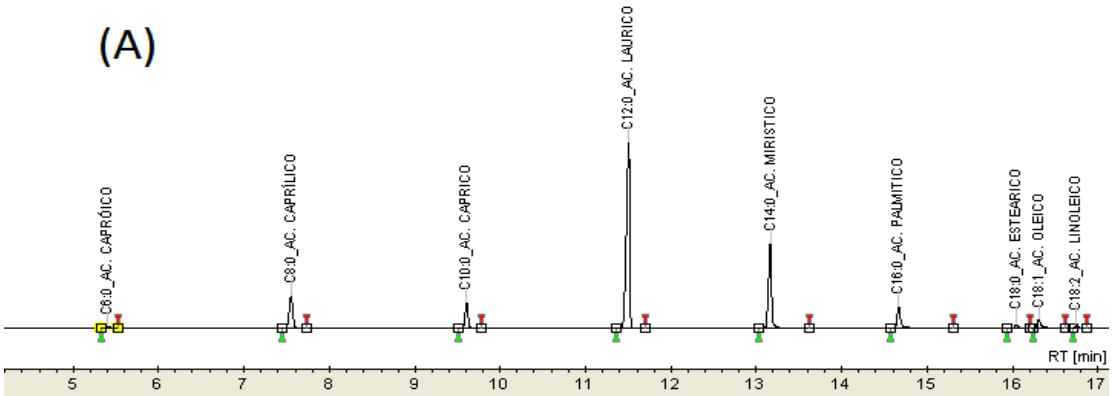
Fonte: Próprio autor

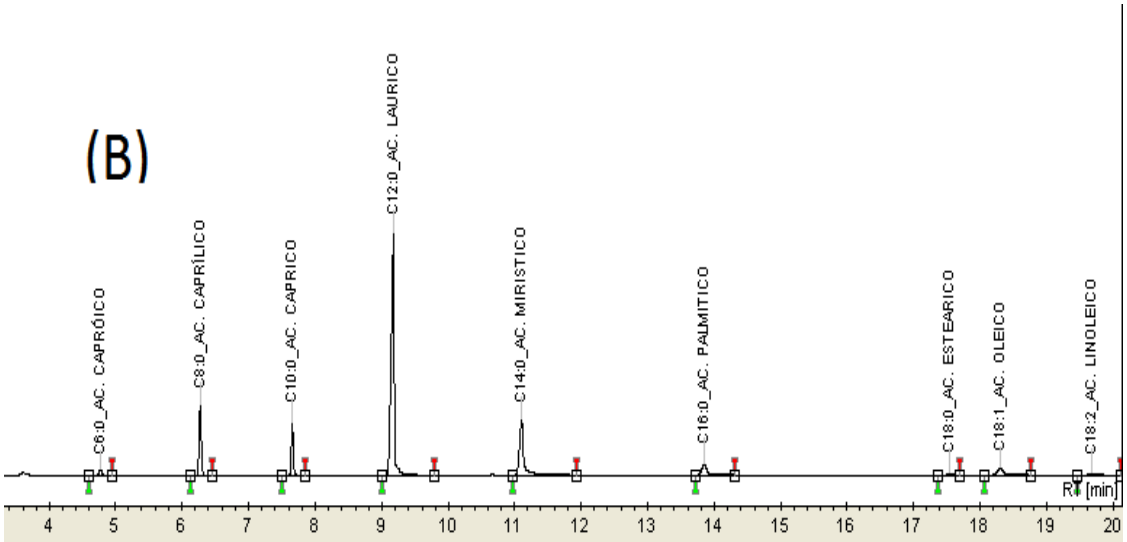
APÊNDICE D: Cromatogramas gerados nas análises do óleo de canola (A) e do hidrolisado obtido pela atuação da lipase de *P. janthinellum* (B)



Fonte: Próprio autor

APÊNDICE E: Cromatogramas gerados nas análises do óleo de Coco (A) e do hidrolisado obtido pela atuação da lipase de *P. purpurogenum* (B)

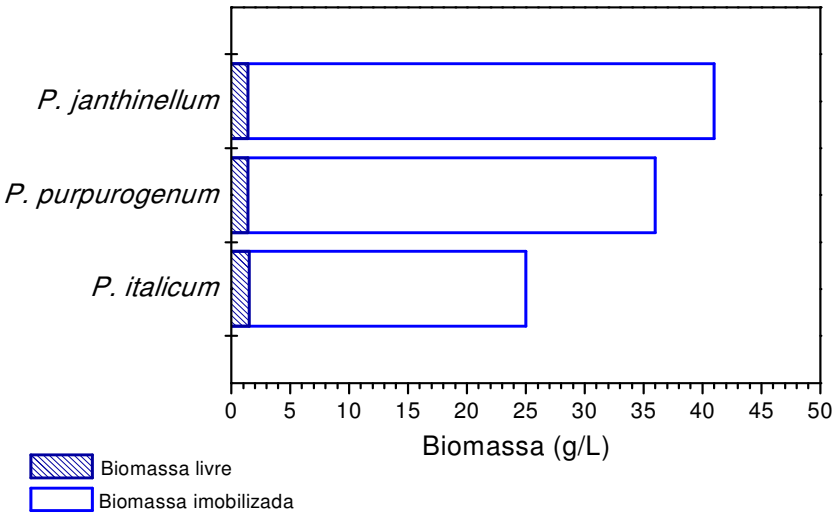




APÊNDICE F: Testes de imobilização *in situ* de células íntegras obtidas no cultivo das espécies de *Penicillium* selecionadas

O objetivo desses testes complementares foi selecionar o suporte que proporcionasse a melhor aderência aos fungos selecionados, mantendo elevada atividade hidrolítica dos biocatalisadores imobilizados. Os fungos foram imobilizados em cubos de espumas de poliuretano (comercial e formulada), bem como em mantas abrasivas de fibra de carbono, de acordo com metodologia anteriormente estabelecida para o fungo de *Mucor circinelloides*. A espuma formulada refere-se a EPU-3, código adotado para espuma manufaturada em laboratório por Rico (2015)*. Os cubos de poliuretano 6x6x6 mm (100 unidades) previamente preparados foram adicionados juntamente ao meio de cultura (100 mL) e após esterilização procedeu-se a inoculação, conforme descrito no item 4.2.1. Ao final de 72 h a biomassa imobilizada foi separada do caldo fermentativo por meio de filtração à vácuo, seguida de lavagens com água e acetona. A atividade lipolítica foi determinada na biomassa imobilizada e no caldo fermentativo de acordo com o item 4.4.1. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras E1 a E4.

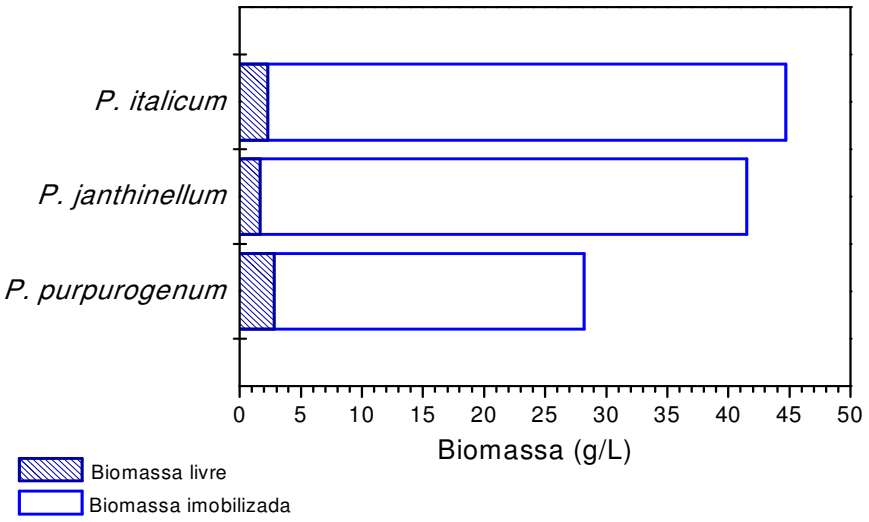
Figura E1. Biomassa imobilizada das lipases de *Penicillium* em espumas de poliuretano comercial



Fonte: Próprio autor

*RICO, A. L. L. Produção enzimática de biodiesel etílico em reator de leito fixo e regime de fluxo contínuo utilizando células íntegras de *Mucor circinelloides* imobilizadas em espuma de poliuretano, 2015, Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo.

Figura E2- Biomassa imobilizada das lipases de *Penicillium* selecionadas em mantas abrasivas de fibra de carbono.



Fonte: Próprio autor

Figura E3- Biomassa imobilizada das lipases de *Penicillium* selecionadas em espumas de poliuretano formulada

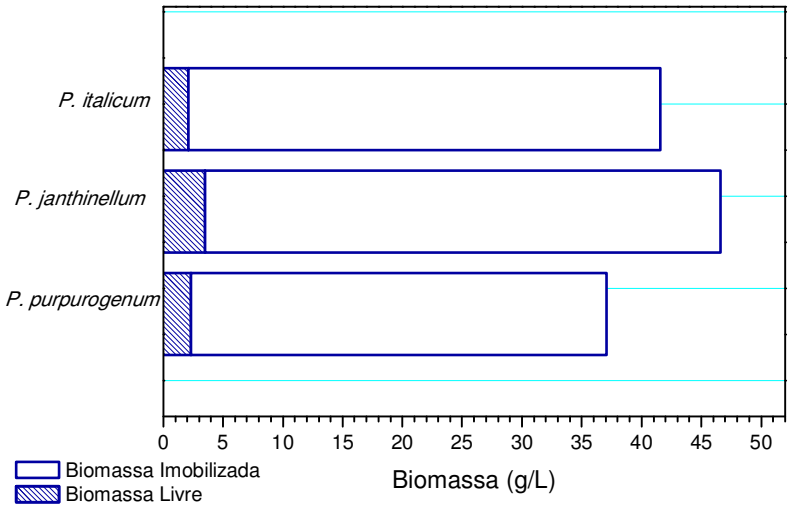
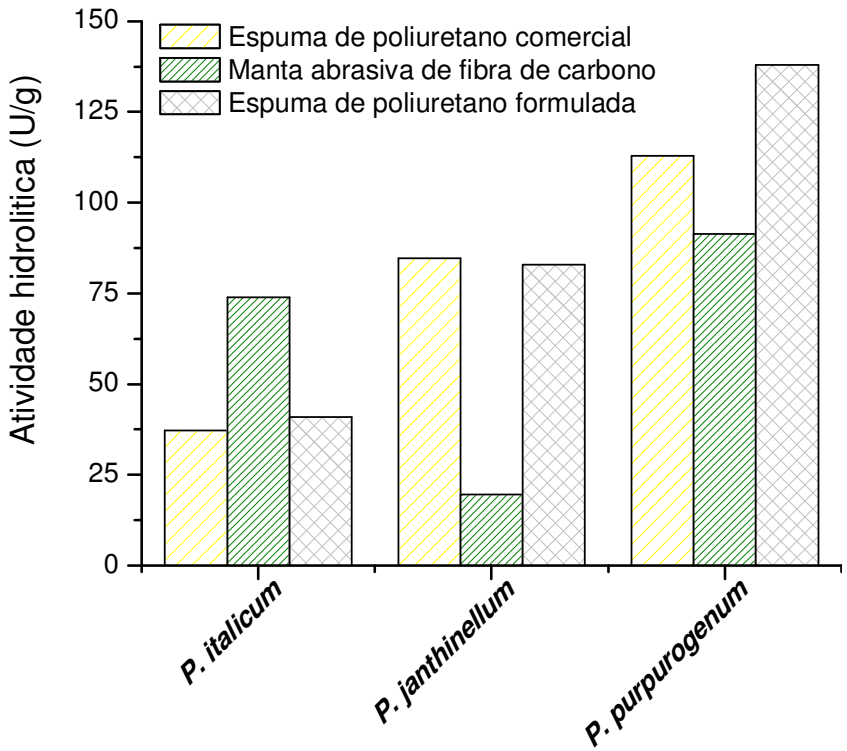



Figura E4- Valores de atividade hidrolítica quantificada na biomassa celular imobilizada em espumas de poliuretano comercial, manta abrasiva de fibra de carbono e espuma de poliuretana formulada.