



**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE ENGENHARIA E ARQUITETURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
Área de Concentração: Infra-estrutura e Meio Ambiente**

**Mirela Roveda**

**Produção de lipases por microrganismos isolados de efluentes de laticínios  
através de fermentação submersa**

**Passo Fundo  
2007**

**Mirela Roveda**

**Produção de lipases por microrganismos isolados de efluentes de laticínios através de fermentação submersa**

Orientador: Marcelo Hemkemeier, doutor  
Co-orientadora: Luciane Maria Colla, mestre

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia para obtenção do título de Mestre em Engenharia na Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo na Área de concentração Infra-estrutura e Meio Ambiente

Passo Fundo

2007

**Mirela Roveda**

**Produção de lipases por microrganismos isolados em efluentes de laticínios através de fermentação submersa**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia para obtenção do título de Mestre em Engenharia na Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo na Área de concentração Infra-estrutura e Meio Ambiente

Data de aprovação: Passo Fundo, 6 de julho de 2007.

Os membros componentes da Banca Examinadora abaixo aprovam a Dissertação.

Marcelo Hemkemeier, doutor.  
Orientador

Ranulfo Monte Alegre  
UNICAMP – Departamento de Engenharia de alimentos da Unicamp

Paulo Roberto Koetz  
Universidade de Passo Fundo

Passo Fundo  
2007

Dedico este trabalho aos meus pais Nelso e Honorina, e ao meu irmão Alessandro por todo amor, carinho e compreensão.

Agradeço ao professor Marcelo Hemkemeier pela orientação deste trabalho, por proporcionar e incentivar o meu crescimento científico e, também por confiar e acreditar no meu trabalho.

Agradeço também a minha co-orientadora, professora Luciane M. Colla, por todo apoio e auxílio prestados no desenvolvimento da minha pesquisa.

Ao professor Paulo Koetz pelo auxílio na realização da parte físico-química da pesquisa.

Ao João, funcionário do laboratório de operações unitárias e de aulas práticas do prédio do Cepa da engenharia de alimentos, pela ajuda prestada.

A Márcia Tibolla pelo auxílio prestado na parte da fermentação dos experimentos.

Aos meus colegas do Mestrado em Engenharia, por todo o companheirismo e amizade.

A indústria de laticínios Parmalat que cedeu o efluente para a realização desta pesquisa.

## Resumo

A produção enzimática é um dos campos mais promissores dentro das tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado, estando em constante crescimento pela grande capacidade dos microrganismos de realizarem transformações químicas. Dentre os produtos obtidos via processos fermentativos através de microrganismos estão as enzimas. As enzimas produzidas por processos fermentativos tem sido utilizadas para o controle ambiental de vários ecossistemas, sendo que muitas destas enzimas podem ser produzidas a partir de resíduos industriais, diminuindo os custos de produção. Os efluentes de laticínios são ricos em gorduras lentamente biodegradáveis, o que dificulta o tratamento destes efluentes em baixas temperaturas. As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de longas cadeias de triglicerídeos transformando-os em glicerídeos e ácidos graxos. As lipases microbianas têm recebido grande atenção, constituindo o mais importante grupo de enzimas para a aplicação biotecnológica. As lipases vêm sendo utilizadas na redução da concentração dos lipídios contidos nos efluentes, promovendo a hidrólise dos óleos e gorduras presentes. Objetivou-se avaliar a produção de lipases por fungos isolados a partir de efluentes de laticínios. O efluente foi coletado na saída do equalizador (P3) e saída do aerador (P6) de uma estação de tratamento de efluentes de laticínios da região de Passo Fundo, sendo caracterizado quanto a DBO, DQO, fósforo, nitrogênio e óleos e graxas, de acordo com a metodologia descrita por APHA (1995). Foi realizado o isolamento de microrganismos dos pontos de coleta através de técnicas de diluições seriadas seguidas de plaqueamento em meio PDA acidificado e incubação a 30° C durante 5 dias. Os microrganismos isolados foram identificados através de técnicas de microcultivo. A seleção dos fungos com potencial de produção de lipases foi avaliada a partir do crescimento dos mesmos em meio PDA contendo azeite de oliva como fonte de carbono. O crescimento dos microrganismos foi acompanhado a partir da medida do diâmetro das colônias diariamente, calculando-se a velocidade de crescimento radial (VCR). Os fungos que apresentaram as maiores VCRs foram utilizados para a produção de lipases via fermentação submersa, utilizando-se como meios de cultivo os efluentes coletados na saída do equalizador e aerador do sistema de tratamento de efluentes da indústria de laticínios, acrescido de nutrientes. A fermentação foi realizada em erlenmeyers de 300 mL, a 30°C em “shaker”. Foram coletadas alíquotas para a determinação da atividade lipásica. A caracterização do efluente indicou valores de DQO de 803,27 a 4975,95 mg/L na saída do equalizador e de 76,58 a 2810,22 mg/L na saída do aerador, o NTK variou de 0,50 a 12,32 mg/L na saída do equalizador e de 1,01 a 35,62 mg/L na saída do aerador, o fósforo total variou de 0,16 a 0,55 mg/L na saída do equalizador e de 0,06 a 0,32 mg/L na saída do aerador e o valor dos óleos e graxas variou de 0,01 a 4,40 na saída do equalizador e de 0 a 5,31 mg/L na saída do aerador. Na etapa de isolamento foram isolados 21 microrganismos, pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Fusarium*. A etapa de seleção selecionou os fungos E6, E7, E8, E9, E10, E12, E17, E20 e E21 devido à capacidade de crescimento em meio contendo azeite de oliva. Na fermentação submersa, os fungos E9 (*Aspergillus*), E21 (*Aspergillus*) e E20 (*Penicillium*) foram os que apresentaram as maiores atividades enzimáticas, de 1,250 a 2,250  $\mu\text{molAG/mL}\cdot\text{min}$ , utilizando-se como meio de cultivo o efluente coletado na saída do equalizador.

Palavras-chaves: produção de enzimas, efluente agroindustrial, gorduras e lipídios.

## **Abstract**

*The enzymatic production is one of the most promising fields inside of the technologies for the synthesis of compound from the high value added, being in constant growth for the great capacity of the microorganisms to carry out chemical transformations. Among the products gotten from fermentative processes through microorganisms are the enzymes. The enzymes produced from fermentative processes have been used for the ambient control for several ecosystems, being that many of these enzymes can be produced from industrial residues, reducing the costs production. The effluent of dairy is rich in slowly biodegradable fats that make difficult the treatment of these effluents in low temperatures. Lipases are a group of enzymes that catalyzes hydrolysis of long chains of triglycerides transforming them into glycerides and fatty acids. Microbial lipase has received great attention, constituting the most important group of enzymes for the biotechnological application. Lipases have being used in the reduction of the lipids concentration contained in the effluent, promoting hydrolysis of the presents oils and fats. The objective of this work was to evaluate the production of lipase from isolated fungus from the dairy effluent. The effluent was collected in the exit of the equalizer (P3) and the exit of the aerator (P6) from an effluent treatment station at a dairy industry in the region of Passo Fundo/RS being characterized as for DBO, DQO, phosphorous, nitrogen and oils and greases, in accordance with the methodology described at APHA (1995). It was carried out through the isolation of microorganisms from the collection points through techniques of series dilutions followed of the plating in medium PDA acidified and incubate at 30° C during 5 days. The isolated microorganisms had been identified through micro culture techniques. The selection of the fungi with potential of lipases production was evaluated from the growth of them in medium PDA added with olive oil as a carbon source. The growth of the microorganisms was followed from the measure of the diameter of the colonies daily, calculating the radial growth velocity (VCR). The fungi that had presented the greater VCRs had been used for the production of lipases in submerged fermentation, using as a medium of culture the effluent collected in the exit of the equalizer and aerator from the effluent treatment system at the dairy industry, increased of nutrients. The fermentation was carried out in erlenmeyers of 500 mL, at 30°C in shaker. An aliquot had been collected daily for the lipase activity determination. The characterization of the effluent indicated values of DQO between 803,27 to 4975,95 mg/L at the exit of the equalizer and the 76,58 to 2810,22 mg/L for DQO in the exit of the aerator, the NTK varied between 0,50 to 12,32 mg/L in the exit of the equalizer and from the 1,01 to 35,62 mg/L in the exit of the aerator, the total phosphorus varied between 0,16 to 0,55 mg/L in the exit of the equalizer and from the 0,06 to 0,32 mg/L in the exit of the aerator and the value of oils and greases varied from 0,01 to 4,40 in the exit of the equalizer and from 0 to 5.31 mg/L in the exit of the aerator. In the isolation stage 21 microorganisms had been isolated, they pertained to the genus of Penicillium, Aspergillus, Trichoderma and Fusarium. The selection stage selected the fungi E6, E7, E8, E9, E10, E12, E17, E20 and E21 due their capacity of growth in medium containing olive oil. In the submerged fermentation, the fungi E9 (Aspergillus), E21 (Aspergillus) and E20 (Penicillium) had been the ones that had presented the biggest enzymatic activity, from 1,250 to 2,250 $\mu$ molAG/mL.min, using as a cultivation medium the effluent collected from the exit of the equalizer.*

**Keywords:** *production of enzymes, effluent agro-industrial, fats and lipids.*

# Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>09</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
2.1 FERMENTAÇÃO SUBMERSA .....	12
2.2 ENZIMAS .....	17
2.2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS .....	19
2.2.2 ESTRUTURA DAS ENZIMAS .....	20
2.2.3 AÇÃO CATALÍTICA .....	22
2.2.4 ESPECIFICIDADE .....	24
2.2.5 INFLUÊNCIA DO MEIO SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	24
2.2.6 CO-FATORES E COENZIMAS .....	26
2.2.7 CINÉTICA DAS REAÇÕES CATALIZADAS PELA ENZIMA .....	28
2.3 LIPÍDIOS .....	29
2.4 LIPASES .....	30
2.4.1 DEFINIÇÃO.....	30
2.4.2 APLICAÇÃO DE LIPASE .....	32
2.4.3 PRODUÇÃO DE ENZIMA .....	35
2.5 FUNGOS .....	41
2.5.1 ESTRUTURA DA CÉLULA FÚNGICA .....	42
2.5.2 MORFOLOGIA FÚNGICA.....	43
2.5.3 CRESCIMENTO E NECESSIDADES NUTRITIVAS .....	44
2.5.4 METABOLISMO .....	45
2.5.5 TAXONOMIA FÚNGICA .....	46
2.6 EFLUENTE DE LATICÍNIOS .....	47
<b>3 MÉTODOS E MATERIAIS.....</b>	<b>52</b>
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE.....	52
3.1.1 DETERMINAÇÃO DA DQO .....	54
3.1.2 DETERMINAÇÃO DA DBO .....	55
3.1.3 NITROGÊNIO TOTAL KJEIDAHN (NTK).....	55
3.1.4 FÓSFORO .....	55
3.1.5 ÓLEOS E GRAXAS .....	56
3.2 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS .....	56
3.2.1 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ATRAVÉS DE MICROCULTIVO .....	56
3.3 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASE .....	58
3.4 PRODUÇÃO DE LIPASE VIA FERMENTAÇÃO SUBMERSA .....	58
3.4.1 MICRORGANISMOS.....	58
3.4.2 PREPARO DO INÓCULO .....	58
3.4.3 MEIO DE CULTIVO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS .....	59
3.4.4 ATIVIDADE LIPÁSICA .....	59
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE.....	61
4.2 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS.....	64
4.3 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASE .....	66
4.4 ATIVIDADE LIPÁSICA .....	69
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>82</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A tecnologia enzimática é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. A tecnologia de produção e de aplicação das enzimas em nível industrial está em poder de algumas companhias internacionais, que não desenvolvem pesquisa no Brasil. A indústria química brasileira importa a maior parte das enzimas bio-catalizadoras de matérias auto-sustentáveis. Os altos custos envolvidos com a tecnologia de produção e a aplicação das enzimas fazem com que poucos grupos brasileiros sejam competitivos na área de tecnologia enzimática, especialmente relacionada às enzimas lipases.

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, especialmente em áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais. Entre os processos de maior interesses estão às reações de hidrólise, as de síntese e as de interesterificação de lipídeos por meio das lipases. O elevado potencial de aplicação das lipases é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos, e sua régio e enantiosseletividade. O reconhecimento dessas vantagens tem proporcionado um aumento considerável na produção e comercialização de lipases, resultando no desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização no setor industrial. As lipases vêm, conquistando uma faixa de mercado crescente das enzimas industriais.

As lipases são encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. As lipases eram obtidas a partir de pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano. As lipases microbianas tinham também um

custo bem mais elevado quando comparado com outras hidrolases, como proteases e carboxilases em função do baixo rendimento do processo fermentativo. Os recentes avanços registrados na tecnologia do DNA têm permitido aos fabricantes de enzimas colocar no mercado lipases microbianas com atividade bem elevada, a um custo bem mais acessível. As lipases microbianas são produzidas por diversas indústrias.

A grande diversidade de microrganismos brasileira justifica a busca por novos produtores de enzimas com características especiais, que podem ser aplicadas na produção de compostos de química fina através da biocatálise.

Os fungos filamentosos são considerados bons produtores de enzimas, e as lipases fúngicas são as preferidas para aplicação industrial.

As enzimas são na maioria das vezes produzidas na presença de um indutor, que muitas vezes pode ser o próprio substrato ou o produto da hidrólise do mesmo, que podem ser adicionados ao meio de várias maneiras.

A utilização de enzimas no tratamento de despejos industriais têm sido desenvolvida como alternativa ao tratamento convencional de efluentes e tem despertado grande interesse para pesquisa, em função das vantagens apresentadas.

A quantidade de proteínas e lipídios que entra nas plantas de tratamento de efluentes fica entre 60 – 70% do total de matéria orgânica. No processo de lodo ativado uma elevada variedade de microorganismos participam do processo de remoção da matéria orgânica. Mas apenas pequenas moléculas podem ser capturadas diretamente pelos microorganismos para o metabolismo intracelular. Conseqüentemente, uma grande fração da matéria orgânica do tratamento deve ser enzimaticamente hidrolisada através de uma série de reações hidrolíticas a unidades menores, que podem ser capturadas pelas células bacterianas presentes no sistema. Nos dias atuais, está havendo um crescente interesse no estudo das exoenzimas em corpos de águas naturais e em plantas de tratamento de efluente. O conhecimento da variação espacial e temporal das enzimas em tais ecossistemas, dos organismos produtores de diferentes enzimas, e nos fatores que afetam a atividade das enzimas, é importante compreender para otimizar a remoção da matéria orgânica em plantas de tratamento do de efluente.

Os processos alternativos vêm sendo utilizados na redução da concentração de lipídeos contidos em efluentes por meio de ação de enzimas, particularmente as lipases. As enzimas

apresentam uma importância particular, pelo fato de hidrolisarem especificamente óleos e gorduras, o que pode ser de grande interesse para o tratamento de efluentes com alto teor de gordura. As lipases compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânico-aquoso, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílico, presentes em acilgliceróis. A utilização das lipases reduz os níveis de sólidos suspensos e lipídeos, o que possibilita melhores condições de operação no tratamento anaeróbio e desobstrui filmes de óleos em tubulações, resultando no aumento da vida útil dos equipamentos.

A questão desta pesquisa foi verificar se os microrganismos presentes no efluente de laticínios produzem lipases, utilizando um meio de cultura de baixo custo.

O objetivo geral foi avaliar a produção de lipases em fermentação submersa por microrganismos isolados de efluente de laticínios. Os objetivos específicos foram:

- a) Caracterizar o efluente dos pontos de coleta (saída do equalizador e do aerador);
- b) Isolar microrganismos presentes no efluente de laticínios;
- c) Identificar os microrganismos isolados do efluente de laticínios;
- d) Selecionar os microrganismos com potencial de produção de lipases;
- e) Avaliar a produção de lipase pelos microrganismos selecionados utilizando como meio de cultivo o efluente coletado na saída do equalizador e do aerador da ETE.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Fermentação submersa

O processo fermentativo industrial consiste em várias etapas, que são divididas em: operações de *upstream* (pré-tratamento da matéria-prima), quando se trata das etapas pré-fermentação, ou seja, que antecedem a operação do reator e cuja finalidade é colocar o sistema nas condições previamente escolhidas, para que as transformações, no reator, se desenvolvam em condições ótimas; e operações de *downstream* (obtenção do produto), quando se refere às etapas que ocorrem após a fermentação, que englobam a separação e purificação dos produtos e subprodutos obtidos, bem como o tratamento dos resíduos formados (BORZANI et al., 2001).

Os processos submersos consistem naqueles em que o microrganismo é introduzido em um meio líquido na forma de um inóculo, sendo o meio contido em fermentadores providos de agitação e aeração (microrganismos aeróbios) (REGULY, 2000) e outros controles, tais como: medidores de pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, entre outros. Os nutrientes encontram-se dissolvidos no meio líquido tornando-se facilmente acessíveis para utilização pelos microrganismos.

O processo de produção é delicado e sofre a interferência de grande número de variáveis, que tornam baixas as chances de êxito. A idade da cultura também interfere, as culturas jovens são mais produtivas. A temperatura de armazenamento dos esporos também influi, tendo-se verificado que melhor é a faixa de 0 a 5°C. Interfere, ainda, a composição do meio de esporulação (LIMA et al., 2001).

Os processos de fermentação submersa (FSm) foram ampliados mundialmente com a produção de antibióticos, devido à importância da penicilina durante a segunda guerra

mundial, tendo sido realizadas inúmeras pesquisas a fim de conhecer a cinética destes processos, os dados de dimensionamento e controle de biorreatores (PANDEY, 2000).

A fermentação é uma manifestação fisiológica da célula viva, podendo ser definida como desassimilação (catabolismo de matéria orgânica como carboidratos, gorduras e proteínas) através de reações acopladas, catalisadas por enzimas intra e extracelulares, acarretando formação de substâncias intermediárias dos produtos finais da oxidação biológica total, ou então, derivados destas substâncias (REGULY, 1996). Já no sentido tecnológico, significa todo processo em que atuam microrganismos sobre os substratos orgânicos, através de seu metabolismo, produzindo determinadas substâncias ou substratos modificados de maior valor agregado. Essas substâncias ou produtos de fermentações vão desde alimentos modificados e bebidas alcóolicas, a outros produtos industriais, como solventes, ácidos orgânicos, enzimas, vitaminas, antibióticos, hormônios, biopolímeros e proteínas unicelulares (PRESCOTT, 1962).

Os processos fermentativos podem substituir processos puramente químicos, de síntese orgânica, no entanto, aqueles utilizados em escala industrial geralmente dependem da capacidade do microrganismo responsável em proporcionar bom e regular rendimento econômico do produto, a partir de um substrato barato e disponível, da facilidade de recuperação ou obtenção do produto visado, sob forma pura ou, conforme o caso, pronta para o uso e da impossibilidade ou dificuldade de se obter o produto através de outros processos (REGULY, 1996).

O processo fermentativo começa com a escolha do agente biológico adequado (microrganismo ou enzima); segue com a transformação da matéria-prima, em condições que podem exigir esterilização, aeração e controle do processo (pH, temperatura etc.); e finaliza com a separação e purificação do produto final (MAKAJOVICH, 2004).

A parte central de um processo fermentativo é o crescimento do microrganismo industrial em condições ambientais que estimulem a síntese do produto comercial que se pretende obter, portanto, conforme TREVAN *et al.* (1990), faz-se necessário conhecer os microrganismos, controlar seu metabolismo e crescimento, bem como, manejá-los em grande escala.

No processo fermentativo, a escolha do microrganismo é extremamente importante para o sucesso da produção desejada. A  $\alpha$ -amilase, por exemplo, pode ser produzida por, no

mínimo, 28 diferentes cultura microbiana. A cultura de *Aspergillus niger* tem a capacidade de produzir mais de 19 tipos de diferentes enzimas, dependendo da indução e/ou do substrato utilizado (SCHMIDELL et al., 2001).

Os meios de obtenção de microrganismos de interesse industrial podem ser: isolamento a partir de recursos naturais, compra em coleções de culturas, obtenção de mutantes naturais, obtenção de mutantes induzidos por métodos convencionais e obtenção de microrganismos recombinantes por técnicas de engenharia genética. Após a obtenção do microrganismo, ele deve ser isolado, para que se consiga uma cultura pura, sendo que essa cultura deve ser mantida e cultivada em laboratório, observando-se as condições ótimas de pH e temperatura para garantir a sua manutenção. Na etapa seguinte, se dá o preparo do inóculo em laboratório, que tem por finalidade conservar a cepa viável e com capacidade produtiva. A partir da cultura estoque, propaga-se o microrganismo por meio de metodologia conveniente até que atinja o volume adequado, em dimensão industrial, para então ser introduzido no fermentador (BORZANI et al., 2001).

Segundo Lima et al. (2001), chama-se inóculo o volume de suspensão de microrganismo de concentração adequada, capaz de garantir em condições econômicas a fermentação de um dado volume de mosto.

O volume do inóculo, bem como sua concentração de células, depende do processo de fermentação subsequente e do volume de mosto a ser fermentado. Indicando-se como  $V$  a capacidade útil do fermentador, o volume de inóculo pode variar, dependendo da fermentação desejada, de  $0,005V$  a  $0,5V$  (0,5 a 50% da capacidade útil do tanque). A técnica de preparo do inóculo, variável de caso para caso, compreende duas fases: a de laboratório e a industrial (LIMA et al., 2001).

Na fase de laboratório, partindo-se de uma cultura pura, inocula-se um volume relativamente pequeno de meio nutriente, que é, em seguida, incubado em condições favoráveis ao desenvolvimento do microrganismo. A suspensão obtida é transferida para um volume maior de meio que é, por sua vez, adequadamente incubado e, a seguir, transferido para um frasco contendo um volume ainda maior de meio nutriente; e assim por diante, até se conseguirem alguns litros de suspensão microbiana. Os cuidados de assepsia, bem como os volumes de meio utilizados, o número de transferências e as condições de

incubação, variam com o processo de fermentação que se deseja realizar (LIMA et al., 2001).

O cultivo de microrganismo é só uma das numerosas fases do processo. O meio em que cresce o microrganismo deve ser formulado de acordo com as matérias-primas e, posteriormente esterilizado. O conteúdo do fermentador, depois de esterilizado deve ser inoculado com um cultivo viável, metabolicamente ativo. Logo, para que se possa realizar a fermentação é necessária, em primeiro lugar, obter um microrganismo adequado para o processo que se pretenda levar adiante, o que se efetua normalmente selecionando cepas naturais. A produtividade do mesmo deve aumentar até se obter níveis econômicos aceitáveis, o que se realiza mediante melhoras por mutação, recombinação ou melhoria do processo (TREVAN *et al.*, 1990).

O processo fermentativo envolve etapas distintas como, a preservação e o crescimento do inóculo, o pré-cultivo no fermentador e a fermentação de produção.

A preservação das cepas de produção ao longo de um período de tempo é um requisito básico para uma fermentação. Deve-se encontrar um método ótimo de preservação para cada processo e também para cada cepa. As técnicas utilizadas mais freqüentemente são o armazenamento a baixa temperatura (2°C a 6°C); o armazenamento por congelamento (-18°C a -80°C) e a liofilização que é o melhor método de conservação (CRUEGER; CRUEGER, 1993). Outra técnica amplamente difundida é a preservação em ágar inclinado, que pode ser combinada com a refrigeração.

O crescimento do inóculo tem a finalidade de preparar o microrganismo em condições apropriadas, de modo a garantir o desenvolvimento adequado das etapas posteriores. O cultivo preservado se prolifera inicialmente mediante crescimento em um cultivo líquido agitado ou em um meio sólido (quando se quer a formação de esporos). As condições utilizadas no cultivo inicial (meio, temperatura, entre outras) dependerão do processo específico. Os tempos normais de crescimento variam em função do tipo de conservação das cepas, sendo que os cultivos refrigerados crescem em um tempo menor. Para se obter bons rendimentos influi, não só o número de células e esporos, mas também o meio nutritivo utilizado para o inóculo, a temperatura de crescimento e a idade do inóculo (CRUEGER; CRUEGER, 1993).

A concentração ótima de inóculo para um fermentador determina o número de etapas do pré-cultivo que são necessárias. Às vezes, o meio de cultivo de produção se utiliza para a última etapa de formação do inóculo a fim de induzir a formação do produto (CRUEGER; CRUEGER,1993).

Segundo Makajovich (2004), a composição do meio de cultura depende das necessidades metabólicas do microrganismo escolhido. Este deve conter todos os nutrientes necessários nas concentrações adequadas, que variam em função do microrganismo e do objetivo do processo. Os meios de cultura utilizados no laboratório incluem:

- a) água;
- b) uma fonte de energia de carbono: glicose, amido, uréia, soja e outros cereais, etc;
- c) uma fonte de nitrogênio inorgânica (sulfato de amônia, nitrato de potássio, etc.), orgânica (aspargina, succinato de amônia, glutamato, uréia, etc.) ou complexa (farinha de soja, peptona, etc.);
- d) sais minerais, tais como fosfato de potássio, sulfato de magnésio, cloreto de cálcio, etc.;
- e) elementos traços: ferro, zinco, manganês, cobre, cobalto, molibdênio.

O meio de cultivo tem uma forte influência no processo de fermentação e deve possuir os nutrientes requeridos para o crescimento microbiano, e, além disso, deve favorecer a formação do produto que se deseja (BORZANI et al., 2001).

Os meios nutritivos para a produção devem ser otimizados não só nos ingredientes utilizados, mas também na forma em que se prepara o meio. Os parâmetros mais importantes durante a fermentação são a temperatura, a aeração, a pressão e a agitação (CRUEGER; CRUEGER,1993).

Segundo Lima et al. (2001), os meios devem conter fontes de carbono e energia (farinhas amiláceas, licores de milho, soja e outros cereais, melaços), fontes de nitrogênio (farinha de peixe, gelatinas, licores de milho e de soja), substâncias minerais e fatores de crescimento (extrato de levedura, licor de milho, farinhas de sementes oleaginosas). No caso de produção de enzimas indutíveis, a presença de um indutor é essencial (exemplos: amido para amilase, uréia para uréase, xilose para xilose isomerase). A otimização de um meio de cultivo é também, em geral, um processo progressivo de aprimoramento. A influência de certos componentes do meio na produção da enzima-alvo pode ser muito significativa.



A fermentação pelo método de cultura submersa é executada em fermentadores fechados, equipados com agitadores, dispositivos de aeração para introdução de ar estéril, e camisas e serpentinas para o controle de temperatura (PARK, 1983).

Segundo Makajovich (2004), se o processo de fermentação submersa exigir assepsia, esta se consegue mediante a esterilização do meio (dentro ou fora do fermentador), a desinfecção ou esterilização do equipamento por injeção de vapor ou mediante o calor gerado por serpentinas, sendo esta medida extensiva a todos os ductos de entrada e saída e às válvulas correspondentes e a esterilização do ar mediante filtros adequados.

As fermentações são realizadas, normalmente, em uma faixa mesófila em temperaturas ótimas entre 20-45°C. Deve-se escolher a temperatura apropriada para conseguir o máximo crescimento por uma parte e a formação ótima de produto por outra (CRUEGER; CRUEGER, 1993).

Durante o processo de fermentação, uma série de variáveis devem ser controladas, tais como temperatura, pH, pressão e concentração de oxigênio; com o intuito de garantir o máximo de rendimento no decorrer do processo (BORZANI et al., 2001).

A linhagem microbiana utilizada industrialmente é, em geral, fruto de um longo trabalho de melhoramento e, portanto, sigilosamente protegida. A manutenção da linhagem requer um minucioso e permanente trabalho de microbiologia industrial (LIMA et al., 2001).

## **2.2 Enzimas**

As enzimas são catalisadores naturais (JUNG, 2002; MENDES, 2005) e muitas são produzidas pela fermentação de biomateriais (material de natureza diversa com características para serem usados na fermentação).

Segundo Lehninger (1976), as enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são muito superiores aos dos catalisadores produzidos pelo homem.

As enzimas são catalisadores orgânicos produzidos pelas células vivas, que catalisam as reações químicas nos processos vitais. Uma vez elaborada em uma célula, uma enzima

poderá manter-se independentemente da célula, se condições apropriadas forem mantidas (PARK, 1983).

As enzimas são produzidas em escala crescente através de processos fermentativos utilizando-se bactérias e fungos, em crescimento em meios nutritivos apropriados. O Quadro 1 relaciona como exemplos algumas enzimas produzidas industrialmente com o agente fermentativo, o meio de cultivo, o sistema de fermentação usado e o seu uso prático (REGULY, 1996).

As enzimas são obtidas de três grandes fontes:

- a) vegetais superiores (malte-amilase, papaína, bromelina, ficina);
- b) animais superiores (enzimas pancreáticas, pepsina, catalase, renina); e
- c) microrganismos (amilases, proteases, pectinases, lipases, invertase, glicose-oxidase, celulase, glicose-isomerase (PARK, 1975).

Quadro 1: Enzimas produzidas industrialmente (conf. BACKHORN e outros, 1965 apud REGULY, 1996).

<b>Enzima produzida por fermentação industrial</b>	<b>Agente formador</b>	<b>Meio de cultivo</b>	<b>Sistema de fermentação</b>	<b>Uso da enzima</b>
$\alpha$ amilase bacteriana termoestável	<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus licheniformis</i>	Farinha de soja desengordurada, farelos de cereais, autolisados de leveduras, água de remolho de cereais.	Cultivo líquido submerso ou cultivo semi-sólido conforme o meio.	Liquefação de amido (pressacarificação) no preparo de mostos para produção de álcool e bebidas alcoólicas. Preparo de xaropes de glicose, panificação, adesivos de dextrinas.
Protease bacteriana	<i>Bacillus licheniformis</i>	Água de remolho de milho	“	Detergentes enzimáticos e produção de gelatina.
Lactase	<i>Aspergillus oryzae</i>	Meios amiláceos; farinhas e farelos de arroz, trigo, centeio e soja	“	Adoçamento de leite, impedimento de cristalização de sorvete.
Glicoamilase (amiloglicosidase)	“	“	“	Sacarificação de mostos amiláceos para produção de álcool, bebidas alcoólicas e xaropes de glicose.

Lactase	<i>Aspergillus niger</i>	“	“	(vide lactase de <i>A. oryzae</i> )
Glicoamilase	“	“	“	(vide enzima de <i>A. oryzae</i> )
Glicose-oxidase	“	“	“	Remoção de glicose de ovo desidratado. Remoção de O <sub>2</sub> de enlatados. Análise de glicose em sangue e urina.
Celulase	“	Meios amiláceos: farinhas e farelos de arroz, trigo, centeio e soja, além de polpas	“	Processamento de frutas e hortaliças.
Lipase	“	Meios amiláceos: farinhas e farelos de arroz, trigo, centeio e soja.	“	Processamento de laticínios: aromatização. Produção de ácidos graxos. Detergentes enzimáticos.
Pectinase	“	Meios amiláceos: farinhas e farelos de arroz, trigo, centeio e soja, além de polpas de frutas e hortaliças	“	Clarificação de sucos de frutas. Correção de viscosidade de vinhas.
Celulase	<i>Trichoderma reesei</i>	Meio contendo celulose e hemicelulose, resíduos agrícolas, previamente tratados	“	Produção de glicose de polpas celulósicas.

### 2.2.1 Caracterização das enzimas

Uma das características salientes das enzimas é sua especificidade sobre o substrato. As enzimas atacam um número muito limitado de compostos, e não tem qualquer efeito sobre os outros. As reações enzimáticas se processam sob condições brandas de temperatura e pH (PARK, 1983).

As propriedades adicionais das enzimas são a atividade de baixa concentração, a rapidez de ação e a não toxicidade. São empregadas em indústrias farmacêuticas, alimentícias, têxteis, de couro, de papel e de minérios (PARK, 1983).

As enzimas são essenciais para a vida. Elas catalisam todas as reações bioquímicas na célula, que na ausência dela se processariam tão lentamente que não sustentariam a vida (KREUZER, 2002). As enzimas apresentam como características:

- a) diminuir a energia de ativação, levando a altas velocidades de reação,
- b) serem muito específicas,
- c) serem sintetizadas pelas próprias células onde atuam,
- d) ter concentração celular variável, de acordo com as condições fisiológicas e
- e) podem ter sua atividade modulada, permitindo um ajuste fino do metabolismo ao meio ambiente (BORZANI et al., 2001).

### **2.2.2 Estrutura das enzimas**

Segundo Lehninger (1995), todas as enzimas são proteínas. A sua atividade catalítica depende da integridade da sua conformação protéica nativa. A atividade catalítica geralmente se perde caso uma enzima seja desnaturada ou dissociada em subunidades. A atividade catalítica é sempre destruída quando uma enzima é quebrada em seus aminoácidos componentes. Assim, as estruturas protéicas primária, secundária, terciária e quaternária das enzimas são essenciais para o exercício da atividade catalítica.

As enzimas são proteínas globulares e, como todas as proteínas, são heteropolímeros de vinte diferentes aminoácidos; algumas incluem em sua estrutura um componente não protéico, designado grupo prostético. Com exceção da prolina, os aminoácidos componentes das proteínas apresentam uma porção comum: um átomo de carbono ligado a uma carboxila, a um grupo amino e a um átomo de hidrogênio. O quarto substituinte do carbono é uma cadeia, chamada grupo R, específica para cada aminoácido. As propriedades particulares de cada aminoácido são dadas, portanto, pelo grupo R (BORZANI et al., 2001).

A estrutura protéica e, portanto, das enzimas, pode ser classificada em estrutura primária, secundária, terciária e quaternária.

Na estrutura primária, os aminoácidos estão ligados uns aos outros através da ligação peptídica, estabelecida entre o grupo  $\alpha$ -carboxila de um aminoácido e o grupo  $\alpha$ -amino do aminoácido subsequente, formando uma longa cadeia (BORZANI et al., 2001).

Na estrutura secundária existem dois tipos diferentes de organização regular, encontradas nas enzimas. A cadeia peptídica pode ter segmentos organizados em  $\alpha$ -hélice. Essa estrutura é formada e estabilizada por pontes de hidrogênio estabelecidas entre o átomo de nitrogênio e o átomo de oxigênio. Cada ligação peptídica oferece os elementos para a formação da ponte de hidrogênio: um átomo de hidrogênio covalentemente ligado ao nitrogênio e o oxigênio preso ao carbono por uma dupla ligação. O segundo tipo de estrutura secundária encontrada nas proteínas é chamada folha  $\beta$ -pregueada. Essa estrutura é formada por um arranjo paralelo de dois ou mais segmentos de cadeias peptídicas quase totalmente distendidas e também é mantido por pontes de hidrogênio formadas pelos mesmos elementos que constituem as pontes de hidrogênio da  $\alpha$ -hélice. Nesse caso, a ponte de hidrogênio une dois segmentos distintos da cadeia protéica, e situa-se em posição perpendicular ao eixo da cadeia polipeptídica (BORZANI et al., 2001).

A estrutura terciária descreve a conformação tridimensional que a molécula protéica assume em solução, explicando o dobramento da cadeia peptídica com os enrolamentos, dobras e voltas que a compõem e que a levam a uma forma geral globular. As ligações químicas que estabelecem e mantêm a estrutura terciária são formadas sempre entre os grupos R dos aminoácidos, que variam em número e em posição para cada enzima e a organização espacial também varia para cada enzima. Para entender o enovelamento da cadeia protéica, em primeiro lugar, os grupos R dos aminoácidos podem ser divididos em dois tipos. Cerca de metade deles são apolares (hidrofóbicos) e os outros são polares. Entre estes, alguns apresentam carga elétrica líquida (positiva ou negativa) e os restantes, embora não tenham carga elétrica, são polares por apresentar regiões do grupo R mais negativas e regiões mais positivas. Como a água é um solvente polar, os grupos R apolares tendem sempre a aproximar-se uns dos outros (de forma a excluir a água) e, no seu conjunto, situarem-se voltados para o interior da molécula, enquanto os grupos polares voltam-se para a superfície. Essa localização diferencial dos grupos R, provocada pelas *interações hidrofóbicas*, constitui uma força poderosa de dobramento da cadeia polipeptídica. É

importante ressaltar que a forma espacial da enzima, responsável pela sua função, é resultado indireto de sua estrutura primária (BORZANI et al., 2001).

Uma mutação que levasse à troca de um único aminoácido da longa cadeia polipeptídica de uma enzima poderia acarretar sua completa inativação (BORZANI et al., 2001).

Na estrutura quaternária a organização presente nas proteínas compostas por mais de uma cadeia polipeptídica e descrevem quantos e quais monômeros compõem a molécula e como estes monômeros estão associados. As forças que mantêm unidos os monômeros componentes de enzimas com estrutura quaternária são as mesmas que mantêm a estrutura terciária, ou seja, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ligações salinas, formadas, entretanto, entre grupos R de aminoácidos pertencentes a cadeias polipeptídicas diferentes (BORZANI et al., 2001).

Os termos polipeptídicos e proteína não são sinônimos. Polipeptídio é a cadeia constituída pelos aminoácidos ligados por ligações peptídicas; tem, portanto, uma aceção estrutural. A palavra proteína esta associada a uma função. Muitas enzimas são constituídas por uma única cadeia polipeptídica, organizada espacialmente e, por terem uma função, são, consideradas proteínas. Outras enzimas são formadas por duas ou mais cadeias polipeptídicas, iguais ou diferentes, que isoladamente não tem capacidade catalítica; nestes casos, o termo proteína só pode ser aplicado ao conjunto funcional, e não às subunidades.

### **2.2.3 Ação catalítica**

A partir da estrutura protéica pode-se entender melhor a propriedade catalítica das enzimas. O primeiro ponto a considerar é a grande diferença de tamanho entre a enzima e seus substratos. Os reagentes (aqui chamados de substratos) devem ligar-se à molécula da enzima em uma região específica de sua superfície, chamada *sítio ativo*. O sítio ativo é uma cavidade com forma definida, aberta na superfície da molécula globular da enzima, constituída por grupos R de aminoácidos que podem estar distanciados na estrutura primária da proteína, mas que os dobramentos da estrutura terciária trouxeram à proximidade uns dos outros. É esta forma definida de sítio ativo que confere a especificidade à catálise enzimática: para ser reconhecida como substrato uma molécula

deve ter a forma adequada para acomodar-se no sítio ativo e os grupos químicos capazes de estabelecer ligações com os grupos R ali presentes (BORZANI et al., 2001).

A característica distintiva de uma reação catalisada enzimaticamente é que ela ocorre no inteiro dos limites de uma cavidade, ou fenda, na estrutura molecular da enzima chamada sítio ativo. A molécula que se liga ao sítio ativo e que sofre a ação da enzima é chamada de substrato. O complexo enzima – substrato tem papel central na reação enzimática, ele é o ponto de partida para os tratamentos matemáticos que definem o comportamento cinético das reações catalisadas enzimaticamente e para as descrições teóricas dos mecanismos enzimáticos (LEHNINGER, 1995).

A enzima pode empregar maneiras adicionais de catálise para ajudar no rompimento e na formação de ligações, utilizando grupos catalíticos funcionais apropriadamente posicionados. Entre os mecanismos melhor caracterizados estão a catálise ácido base geral e a catálise covalente (LEHNINGER, 1995).

A catálise ácido base geral em muitas reações bioquímicas envolvem a formação de intermediários carregados instáveis que tendem a se romper rapidamente em suas espécies reagentes constituintes, falhando, assim, em completar a reação. Esses intermediários carregados freqüentemente podem ser estabilizados (e, por conseqüência, a reação catalisada) pela transferência (retirada ou adição) de prótons do substrato, ou de um intermediário, formando uma espécie que se rompe nos produtos mais rapidamente do que o faz para regenerar os reagentes. A transferência de prótons pode envolver apenas os constituintes da água, ou pode envolver outros doadores e receptores fracos de prótons (LEHNINGER, 1995).

A catálise covalente envolve a formação de uma ligação covalente transitória entre a enzima e o substrato. A ligação covalente formada entre a enzima e o substrato pode ativar o substrato para uma reação subsequente em uma forma tal que é usualmente específica para o grupo ou coenzima envolvido (LEHNINGER, 1995).

A relação espacial entre substrato e enzima não deve ser vista segundo um modelo rígido de chave-fechadura. A aproximação e a ligação do substrato à enzima altera o delicado balanço de forças responsáveis pela manutenção da estrutura tridimensional da enzima, amoldando sua forma à forma do substrato e fazendo-a adquirir uma nova conformação, ideal para a catálise. Assim como a enzima, os substratos tem sua

conformação tencionada e distorcida, aproximando-se da conformação do estado de transição. Além disso, o substrato, corretamente posicionado no sítio ativo, está próximo de grupos R decisivos para a catálise (BORZANI et al., 2001).

A função de um catalisador é aumentar a velocidade de uma reação. Os catalisadores não afetam o equilíbrio da reação (LEHNINGER, 1995).

A velocidade de uma reação química pode também ser acelerada pela adição de um catalisador. Os catalisadores se combinam transitoriamente com os reagentes para produzir um estado de transição que apresenta uma energia de ativação menor do que o estado de transição da reação não catalisada, assim, eles aceleram as reações químicas pela redução da energia de ativação da reação. Quando os produtos de reação se formam, os catalisadores livres se regeneram (LEHNINGER, 1976).

A velocidade de uma reação reflete sua energia de ativação; uma energia de ativação alta corresponde a uma reação lenta. A velocidade das reações pode ser aumentada pela elevação da temperatura, pois desta forma aumenta o número de moléculas com energia suficiente para vencer esta barreira energética. Alternativamente, a energia de ativação pode ser diminuída pela adição de um catalisador. Os catalisadores aumentam a velocidade das reações pela diminuição das energias de ativação. A enzima não é gasta no processo e o ponto de equilíbrio não é afetado (LEHNINGER, 1995).

#### **2.2.4 Especificidade**

A especificidade de ação é um dos atributos mais notáveis das enzimas, de modo que somente certos substratos sofrem sua ação e unicamente um tipo de reação ocorre, sem reações colaterais ou produtos derivados. Se não fosse a especificidade das enzimas, as células brevemente estariam inundadas com reações colaterais e produtos derivados. Outro atributo notável das enzimas é sua enorme capacidade catalítica. Ainda que as enzimas sejam proteínas, sendo, portanto, moléculas relativamente frágeis, elas realizam ações catalíticas extraordinárias em soluções aquosas diluídas, nos pHs biológicos e a temperaturas moderadas, em contraste marcante com as condições relativamente extremas que são, muitas vezes, necessárias para acelerar as reações químicas no laboratório de química orgânica (LEHNINGER, 1976).



A mesma enzima de ligação que fornece a energia para a catálise é também quem faz a enzima específica. Especificidade é a habilidade da enzima de discriminar entre dois substratos competidores. A energia total derivada da interação enzima – substrato é chamada de energia de ligação. O seu significado estende-se além da simples estabilização do complexo enzima – substrato. A energia de ligação é a maior fonte de energia livre usada pelas enzimas para baixar a energia de ativação das reações (LEHNINGER, 1995).

### **2.2.5 Influência do meio sobre a atividade enzimática**

Segundo Borzani et al. (2001), a estrutura e a forma do sítio ativo são uma decorrência da estrutura tridimensional da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura protéica. Isso torna a atividade enzimática dependente do meio ambiente, notadamente do pH e temperatura.

A maioria das enzimas apresenta um valor de pH característico em que sua atividade é máxima; acima ou abaixo desse pH, a atividade se reduz. O pH ótimo de uma enzima não é necessariamente idêntico ao pH de seu meio intracelular normal, que pode estar situado na parte ascendente ou descendente de seu perfil de atividade em função do pH. Isso sugere que a inter – relação pH – atividade enzimática pode ser um fator de controle intracelular da atividade da enzima. A região do pH na qual ocorre a mudança de atividade pode fornecer uma pista para sabermos qual aminoácido está envolvido. Os efeitos do pH precisam ser interpretados com um pouco de cautela (LEHNINGER, 1995).

Em resumo, a influência do pH sobre a catálise enzimática é exercida sobre os grupos dissociáveis de vários aminoácidos. Alguns desses grupos podem fazer parte do sítio ativo ou serem importantes na manutenção da estrutura espacial da molécula. A cada valor de pH, alguns desses grupos apresentam-se protonados ou desprotonados. Existe uma concentração hidrogeniônica que propicia um determinado arranjo de grupos protonados e desprotonados, que leva a molécula de enzima à conformação ideal para exercer seu papel catalítico. Esse pH ótimo depende, portanto, do número e do tipo de grupos ionizáveis que uma enzima apresenta, ou seja, depende de sua estrutura primária. Por outro lado, quando o substrato contém grupos ionizáveis, as variações de pH também poderão afetar sua carga. A

eficiência da catálise dependerá então, de encontrarem-se, enzimas e substrato com conformação e carga adequadas para permitir sua interação (BORZANI et al., 2001).

A velocidade das reações catalisadas por enzima aumenta geralmente com a temperatura, dentro de certa faixa de temperatura na qual a enzima é estável e mantém atividade integral. A velocidade da maioria das reações enzimáticas se duplica aproximadamente para cada elevação de 10°C em temperatura. As enzimas, sendo proteínas, são desnaturadas pelo calor e se tornam inativas à medida que a temperatura é elevada além de certo ponto. O “ótimo” aparente de temperatura é, assim, resultante de dois processos: (1) o aumento normal na velocidade de reação com a temperatura e (2) o valor crescente de desnaturação térmica da enzima acima de uma temperatura crítica. Ainda que muitas enzimas sejam inativadas em temperaturas acima de 55 a 60°C, algumas são bastante estáveis e mantêm a atividade em temperaturas muito mais elevadas (LEHNINGER, 1976).

A influência da temperatura sobre a cinética da reação enzimática deve ser entendida em duas fases distintas: em princípio, aumentos de temperaturas levam a aumentos de velocidades de reação, por aumentar a energia cinética das moléculas componentes do sistema, aumentando a probabilidade de choques efetivos entre elas. Este efeito é observado em um intervalo de temperatura compatível com a manutenção da estrutura espacial da enzima. Temperaturas mais altas levam à desnaturação da enzima, ou seja, à perda de sua estrutura nativa catalítica, por alterarem as ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional. Rompidas as pontes de hidrogênio, que são ligações bastante termolábeis, desencadeia-se uma cascata de alterações estruturais, levando a enzima a uma nova conformação ou a um estado sem estrutura definida; a enzima é dita, então, desnaturada. A temperatura que provoca desnaturação naturalmente varia para cada enzima, mas geralmente, está pouco acima de sua temperatura ótima. A desnaturação protéica é entendida como a perda da estrutura que propicia a função da proteína. Os agentes desnaturantes preservam apenas as ligações covalentes da estrutura protéica, ou seja, as ligações peptídicas (da estrutura primária) e as pontes dissulfeto (da estrutura terciária). Não só temperaturas elevadas levam à desnaturação. Outras variáveis do meio que afetam as ligações químicas têm o mesmo efeito. Assim, valores extremos de pH, provocando

protonação ou desprotonação de grupos, ocasionam a perda da atividade da enzima. Na maior parte dos casos, a desnaturação é um processo irreversível (BORZANI et al., 2001).

### 2.2.6 Co-fatores e coenzimas

Algumas enzimas dependem, para exercer sua atividade, somente de sua própria estrutura como proteína, enquanto outras requerem também um ou mais componentes não – protéicos chamados co-fatores. Os co-fatores são geralmente estáveis ao calor, enquanto que muitas proteínas enzimáticas perdem sua atividade pelo aquecimento. Quando o cofator é removido a proteína remanescente, que é ela própria, cataliticamente inativa recebe o nome de apoenzima (LEHNINGER, 1976).

O cofator pode ser um ou mais íons orgânicos, tais como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$ , ou uma molécula orgânica complexa (metalorgânica) chamada, neste caso, de coenzima. Algumas enzimas requerem ambos, uma coenzima e um ou mais íons metálicos, para exibirem sua atividade. Uma coenzima (ou íon metálico) que está covalentemente ligada à parte protéica da enzima é chamada de grupo prostético. Uma enzima completa, cataliticamente ativa unida à sua coenzima e /ou íons metálicos é chamada de holoenzima. A parte exclusivamente protéica desta enzima é chamada de apoenzima ou apoproteína. As coenzimas funcionam como transportadoras transitórias de grupos funcionais específicos (LEHNINGER, 1995).

Os íons metálicos ligam-se a grupos R de aminoácidos da cadeia protéica ou estão presentes em grupos prostéticos. Cumprem papel decisivo na catálise, participando efetivamente da reação química. Algumas enzimas aceitam vários íons metálicos bivalentes como ativadores, como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Mn}^{2+}$ , enquanto outras exigem um íon específico para a catálise. Esse íon pode ser de Fe, Cu, Ni, Co, Zn, Se ou de outros metais (BORZANI et al., 2001).

As enzimas que requerem íons metálicos são algumas vezes denominadas metaloenzimas. Em algumas metaloenzimas, o componente metálico sozinho já possui uma atividade catalítica primitiva, que é grandemente acentuada pela proteínas enzimática (LEHNINGER, 1976).

As coenzimas funcionam usualmente como transportadores intermediários dos grupos funcionais, de átomos específicos, ou de elétrons que são transferidos na reação enzimática global. Quando a coenzima esta firmemente ligada à molécula enzimática, ela é geralmente denominada grupo prostético (LEHNINGER, 1976).

As coenzimas atuam como aceptores de átomos ou grupos funcionais retirados do substrato em uma dada reação e como doadores destes mesmos grupos ao participarem de uma outra reação e, por isto, diz-se que as coenzimas são transportadas de determinados grupos (Quadro 2). Durante a catálise, coenzima e substrato acham-se alojados no centro ativo da enzima, consistindo a reação na remoção de determinado grupo químico do substrato e sua transferência para a coenzima e vice-versa. Vê-se, portanto, que as coenzimas não apenas sofrem modificações em sua estrutura ao participar de uma reação enzimática, mas são necessárias em quantidades estequiométricas em relação ao substrato. Todavia, o fato de as coenzimas estarem sendo constantemente recicladas, oscilando entre apenas duas formas, permite que suas concentrações celulares possam ser bastante reduzidas, muito menores do que as concentrações de substrato (BORZANI et al., 2001).

Quadro 2: Coenzimas e grupos aos quais se ligam ou desligam em diferentes reações. (BORZANI et al., 2001).

<b>Coenzima</b>	<b>Grupo transportado</b>
Adenosina trifosfato (ATP)	Fosfato
Biotina	CO <sub>2</sub>
Coenzima A	Acila
Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)	Hidrogênio
Tetraidrofolato	Carbono
Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD)	Hidreto
Tiamina pirofosfato (TPP)	Aldeído

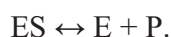
A reação que modifica a coenzima e a reação que restaura sua forma original é catalisada por enzimas diferentes e específicas, que tem em comum apenas o fato de utilizarem a mesma coenzima. Além disso, na maior parte das reações, a ligação da

coenzima à enzima precede a ligação do substrato à enzima. A estrutura química das coenzimas é bastante variável. Algumas coenzimas, como ATP e o GTP (guanosina trifosfato), são integralmente sintetizadas pelas células. Outras apresentam em sua molécula um componente orgânico que não pode ser sintetizado pelos animais superiores. Esse componente, ou um precursor imediato deve então ser obtido através da dieta, constituindo uma vitamina (BORZANI et al., 2001).

### 2.2.7 Cinética das reações catalisadas por enzimas

Os princípios gerais da cinética das reações químicas se aplicam às reações catalisadas por enzimas, porém eles mostram também um aspecto distinto que não se observa usualmente em reações não – enzimáticas, a saturação com o substrato (LEHNINGER, 1976).

Segundo Lehninger (1976), em 1913, uma teoria geral de ação enzimática e cinética foi desenvolvida por L Michaelis e M. L. Menten, que foi mais tarde ampliada por G.E. Briggs e J.B.S. Haldane. Essa teoria, que é fundamental para a análise quantitativa de todos os aspectos da cinética enzimática e inibição, é melhor desenvolvida para o caso simples de uma reação na qual existe somente um substrato. A teoria de Michaelis – Menten considera que a enzima E se combina primeiramente com o substrato S para formar o complexo enzima – substrato ES; este se rompe, e então, em uma segunda etapa para formar a enzima livre e o produto P:



Essas reações são consideradas reversíveis; as constantes de velocidade para as direções da esquerda para a direita e da direita para a esquerda têm, respectivamente, uma indicação positiva e uma negativa (LEHNINGER, 1976).

## 2.3 Lipídios

Os lipídios são compostos orgânicos solúveis em solventes não polares como o benzeno, clorofórmio, e éter, e são praticamente insolúveis em água. Conseqüentemente,

estas moléculas são diversas em suas estruturas químicas e suas funções biológicas. Os lipídios também podem apresentar-se como conjugados à outras macromoléculas como proteínas, polissarídeos, formando lipoproteínas e lipossacarídeos. (BAILEY e OLLIS, 1986).

Os lipídios constituem uma grande parte da biomassa da Terra e as enzimas lipolíticas atuam na modificação destes componentes insolúveis em água. Muitas enzimas processam diferentes substratos específicos já sabidos, enquanto apenas comparativamente poucas enzimas têm estado isoladas em uma forma pura e cristalizadas, e poucas tem sido conhecidas sobre a sua estrutura e função (JUNG, 2002).

Segundo Lehninger (1976), os lipídios possuem várias funções biológicas importantes, servindo como:

- a) como componentes estruturais de membranas,
- b) como formas de armazenamento e transporte de combustível metabólico,
- c) como uma película protetora sobre a superfície de muitos organismos e
- d) como componentes da superfície celular incumbidos do reconhecimento de células, da especificidade de espécies e da imunidade dos tecidos.

## **2.4 Lipases**

### **2.4.1 Definição**

As lipases são um grupo versátil de biocatalizadores e a sua função natural é de hidrolisar os triglicerídeos para glicerídeos e ácidos graxos durante a digestão. Elas são ativas em faixa ampla de pH e temperatura e a maioria das lipases mostram atividade máxima em pH 7 – 9 e temperatura de 30°C – 40°C (BOMSCHEUER, 2002; CASTRO et al. 2004; JUNG, 2002; CARVALHO, 2005).

As lipases (triacilglicerol de acil hidrolases, EC 3.1.1.3) catalisam a hidrólise e a síntese dos ésteres formados do glicerol e dos ácidos graxos de cadeia longa. As lipases ocorrem amplamente na natureza, mas somente as lipases microbianas são comercialmente significativas. As muitas aplicações das lipases incluem sínteses orgânicas, hidrólise das

gorduras e dos óleos, modificação das gorduras, realce do sabor no processamento de alimentos, definição de misturas racêmicas e análises químicas (SHARMA et al. 2005).

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C.3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas, presentes em acilgliceróis e podendo a reação inversa (síntese) ocorrer em ambientes com baixa atividade de água (SAXENA et al., 2003 apud MENDES, 2003). As lipases podem ser classificadas como régio-específicas e não específicas, ambas de grande interesse para o tratamento de efluentes com alto teor de lipídeos (SAXENA et al., 2003 apud MENDES, 2003). As lipases específicas hidrolisam ácidos graxos específicos, como é o caso das lipases de fonte animal que hidrolisam ácidos graxos na posição 1,3 (BENZONANA e DESNUELLE, 1965 apud MENDES, 2003). Esse tipo de tratamento apresenta algumas vantagens tais como a especificidade que permite controlar os produtos, o que leva a um aumento dos rendimentos pela não-geração de subprodutos tóxicos, condições moderadas de operação, redução do custo em termos de energia e de equipamentos tornando este processo atrativo sob o ponto de vista ambiental (MASSE et al. 2001 apud MENDES, 2003).

As lipases catalisam uma série de diferentes reações, além de quebrar as ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise). Elas são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico. Lipases de diferentes fontes são capazes de catalisar a mesma reação, embora possam diferir no desempenho sob as mesmas condições reacionais (CASTRO et al. 2004).

A enzima pode ser específica com relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato. As lipases são divididas em 3 grupos baseados em sua especificidade.

- a) Lipases não específicas que quebram a moléculas de acilglicerol na posição randômica, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis como intermediários. Neste caso, os produtos são similares àqueles produzidos por catálise química, porém com menor grau de termodegradação, devido à temperatura na biocatálise ser bem inferior.
- b) Lipases 1,3 específicas liberam ácidos graxos das posições 1 e 3 e formam, por essa razão, produtos com composições diferentes daquelas obtidas pelas lipases não regiosseletivas ou mesmo pelo catalisador químico.

c) Lipases ácido graxo específicas são lipases com ação específica na hidrólise de ésteres, cujos ácidos graxos são de cadeia longa insaturada com duplas ligações, em cis no carbono 9 (CASTRO et al. (2004)).

As lipases microbianas são mais utilizadas do que as vegetais e, na sua grande maioria, não são nocivas à saúde humana, sendo reconhecidas como “Generally Recognized as Safe – GRAS”. Do ponto de vista industrial, os fungos são especialmente valorizados como produtores de enzimas, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação. Os trabalhos relatados em literatura sobre lipases fúngicas são numerosos, sendo que os mais extensivamente estudados são os fungos *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus delemar* e *Penicillium cyclopium*. As lipases têm sido utilizadas em indústrias de alimentos (desenvolvimento de aromas e maturação de queijos), de detergentes, óleo químicas (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biosurfactantes) e para tratamento de resíduos oleosos provindos da indústria do couro e de papel (CARVALHO, 2005).

As lipases hidrolisam os triglicerídeos em di ou monogliceróis e ácidos graxos. São geralmente enzimas extracelulares. Os fungos produtores de lipases incluem *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Geotrichum* e as leveduras *Torulopsis* e *Cândida*. Entre as bactérias produtoras de lipase se encontram: *Pseudomonas*, *Achromobacter* e *Staphylococcus*. Destes organismos se utilizam comercialmente *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, e *Cândida* aunstrup (CRUEGER, 1993).

As lipases são sintetizadas na presença de indutores, sendo estes o farelo de trigo, farelo de arroz, dextrinas, bagaço da cana-de-açúcar, pedaços de coco e óleo de oliva. As lipases podem ser produzidas por meio sólido ou por fermentação submersa (UL-HAQ, 2001).

Segundo Gupta (2003), lipases são um importante grupo de enzimas biotecnologicamente relevante e elas encontram imensas aplicações em indústrias alimentícias, laticínios, detergentes e farmacêuticas. Lípases bacterianas são na maioria das vezes extracelular e são produzidas por fermentação submersa.



## 2.4.2 Aplicação

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas aumentaram gradativamente, principalmente, nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais. Entre os processos de maior interesse estão às reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídios por meio das lipases. As razões do enorme potencial biotecnológico dessas enzimas incluem fatos relacionados com (CASTRO et al. (2004):

- a) sua alta estabilidade em solventes orgânicos;
- b) não requerem a presença de co-fatores;
- c) possuem uma larga especificidade pelo substrato e,
- d) exibem uma alta enantiosseletividade.

Atualmente, as aplicações industriais das lipases estão concentradas nas indústrias de detergentes. Novas aplicações vêm se estabelecendo nos mais diversos campos, tais como indústrias farmacêuticas, químicas finas, cosméticas, oleoquímica, couros, polpa de celulose e papel e no tratamento de resíduos industriais. As lipases vêm conquistando uma faixa crescente do mercado de enzimas industriais (CASTRO et al. 2004).

Os benefícios particulares oferecidos por enzimas são a especificidade, as suaves condições e a redução do desperdício. Isto pode ser possível pela escolha da enzima certa para controlar quais os produtos são produzidos (JUNG, 2002).

As enzimas lipolíticas estão atraindo uma enorme atenção por causa do seu potencial biotecnológico. Elas constituem o mais importante grupo de biocatalizadores para aplicações bioquímicas. O alto nível de produção de lipase por microrganismos requer não somente a super expressão dos genes correspondentes, mas também um entendimento detalhado dos mecanismos moleculares governando suas dobras e secreção (JUNG, 2002).

O uso de enzimas em biocatálise ambiental vem ao encontro da forte tendência dos governos atuais de intensificar as restrições à poluição ambiental. No caso brasileiro, o controle ambiental é ainda mais relevante à preservação dos ecossistemas que, em função da sua extensão e biodiversidade, constituem um ativo de valor incalculável, além de garantir a representatividade nacional no cenário mundial (MENDES, 2005).

As lipases microbianas constituem um importante grupo de enzimas valiosas, devido à versatilidade de suas propriedades e a fácil produção em massa. As lipases microbianas são amplamente diversificadas em suas propriedades enzimáticas e especificidade do substrato, o que as torna muito atrativas para a aplicação industrial (HASAN, 2006).

A extraordinária diversidade microbiana e a importância dos fungos como produtores de enzimas, justifica a busca de novos biocatalisadores com características especiais e passíveis de aplicação em biocatálise (CARVALHO, 2005).

As lipases apresentam uma importância particular, pelo fato de hidrolisarem especificamente os óleos e graxas, e isto pode ser de grande interesse para diferentes finalidades industriais, entre elas o tratamento de efluentes industriais com alto teor de gordura, como é o caso dos efluentes gerados em laticínios. Quanto ao processo de obtenção das lipases, existem dois processos disponíveis e em uso na produção comercial de enzimas, que são a fermentação submersa e a fermentação em meio sólido (LEAL, 19\_\_).

As lipases podem ser utilizadas diretamente na forma bruta (caldo fermentado) ou isoladas para promover um pré-tratamento do efluente antes da digestão anaeróbia. Entretanto, estudos têm sido realizados para verificar a possibilidade de cultivo de microrganismos produtores de lipases do gênero *Penicillium* em associação com a digestão do efluente de extração de azeite de oliva (MENDES, 2005).

As lipases são extensivamente usadas na indústria de laticínios para a hidrólise da gordura do leite (HASAN, 2006).

As lipases são utilizadas em lodo ativado e outro processo de tratamento de águas residuárias aeróbicas, nos uma fina camada de gordura deve ser continuamente removida da superfície dos tanques aerados para permitir o transporte de oxigênio. A espuma rica em gordura é digerida com lipases (GANDHI, 1997).

Segundo Mendes (2005) e CASTRO et al. (2004), o tratamento de efluentes com enzimas apresenta algumas vantagens, tais como a especificidade que permite controlar os produtos, o que leva a um aumento dos rendimentos pela não geração de subprodutos tóxicos, condições moderadas de operação, redução do custo em termos de energia e de equipamentos, simplicidade e facilidade no controle do processo; não há necessidade de aclimatação de biomassa; não há efeitos de choque por carga de poluentes, aplicação em

processos com baixa ou alta concentração de poluentes; operação em amplas faixas de pH, temperatura e salinidade, tornando este processo atrativo sob o ponto de vista ambiental. Para viabilizar economicamente este tipo de tratamento, alguns pontos de natureza técnica devem ser considerados. É necessário conhecer em detalhes os processos industriais responsáveis pela produção dos efluentes: suas variações ao longo do tempo, os insumos empregados, o regime de descarga dos efluentes, o procedimento para limpeza das instalações, sua frequência e produtos utilizados para esse fim. Todos esses detalhes operacionais podem influenciar na qualidade dos efluentes. É necessário também fazer uso de preparações enzimáticas ativas e otimizar as condições adequadas de hidrólise.

A aplicação de lipases tem sido também preconizada na degradação biológica e remoção de carga lipolítica tornado o substrato mais facilmente biodegradável nos efluentes industriais gerados em frigoríficos, abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral. Essas indústrias produzem um elevado teor de resíduos líquidos e sólidos, com odores desagradáveis, que prejudicam intrínseca e extrinsecamente as unidades industriais. Além disso, esses resíduos contêm elevados teores de demanda bioquímica e química de oxigênio (DBO e DQO), tendo em vista que o conteúdo de gorduras aumenta a concentração de matéria orgânica. Neste contexto, processos alternativos que visam a recuperação ou diminuição da carga de gorduras de efluentes são de extremo interesse para a indústria. Um tratamento preliminar desses efluentes por meio da ação das lipases reduz o teor de lipídeos, o diâmetro das partículas de gorduras em até 60% e o tempo de residência do efluente nas lagoas de estabilização (CASTRO et al. 2004).

O elevado potencial de aplicação das lipases é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos, e sua regio e enantioseletividade (FERNANDES et al., 2004).

A Tabela 1 sintetiza as principais aplicações das lipases em diferentes tipos de indústrias de acordo com Castro & Anderson (1995) apud Maldonado (2006).

Tabela 1 – Aplicações industriais de lipases

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

Fonte: Castro & Anderson (1995) apud Maldonado (2006).

### 2.4.3 Produção de lipases

Durante o início do século XX, houve um crescente conhecimento da enorme capacidade dos microrganismos em realizar transformações químicas. Logo, pesquisas sobre as atividades químicas dos microrganismos – a bioquímica – começaram a fornecer várias informações. Parece não haver limites para os tipos de substâncias que podem ser decompostas ou o tipo de novos compostos químicos produzidos pelos microrganismos (PELCZAR, 1996).

Os fungos, os protozoários, as algas, as bactérias e os vírus estão presentes nas águas residuárias. A eficiência do processo de tratamento depende das alterações bioquímicas conduzidas pelos microrganismos. Muitos fungos e bactérias sintetizam e secretam enzimas industrialmente úteis no meio circundante (PELCZAR, 1996).

As enzimas de interesse industrial, em especial as lipases, têm sido produzidas tradicionalmente por fermentação submersa. Entretanto, a fermentação em estado sólido pode ser uma alternativa muito interessante quando se utiliza como meio de fermentação um rejeito de baixo custo (GUTARRA, 2005).

Segundo Sharma (2002), as lipases são produzidas por muitos microrganismos e principalmente por eucariotos. Muitas lipases úteis comercialmente são de origem microbiológica. Os microrganismos produtores de lipase incluem as bactérias, fungos, leveduras e actinomicetos.

Os microrganismos produtores de lipase tem sido encontrados em diversos habitats tais como resíduos industriais, indústrias de processamento de óleo vegetal, laticínios, solo contaminado com óleos e sementes oleaginosas (SZTAJER et al., 1998 apud SHARMA, 2002), pilhas de adubos químicos, extremidades do carvão e termas quentes (WANG et al., 1995 apud SHARMA, (2002)).

Os processos de fermentação, inclusive os de produtos alimentícios fermentados, são manifestação de reações enzimáticas. Após o conhecimento da natureza das enzimas que atuam nos processos fermentativos, foi natural que se procurasse isolá-las, pois seriam mais fáceis de manipular, permitiriam padronizar sua potência e agiriam mais especificamente, do que os microrganismos intactos. Tais enzimas microbianas isoladas têm uma história de uso em alimentos preparados comercialmente e em produtos alimentícios como, por exemplo, o pão (PARK, 1983).

O primeiro passo na fabricação de enzimas microbianas comerciais é a seleção de um microrganismo que, quando cresce em cultura pura, produza a enzima desejada em grande quantidade. As linhagens específicas de microrganismos empregados na produção de enzimas eram originalmente obtidas por isolamento a partir de fontes naturais ou das culturas mantidas em coleções estabelecidas, como as de vários laboratórios (PARK, 1983).

A Figura 1 apresenta o procedimento para a produção de enzima microbiana

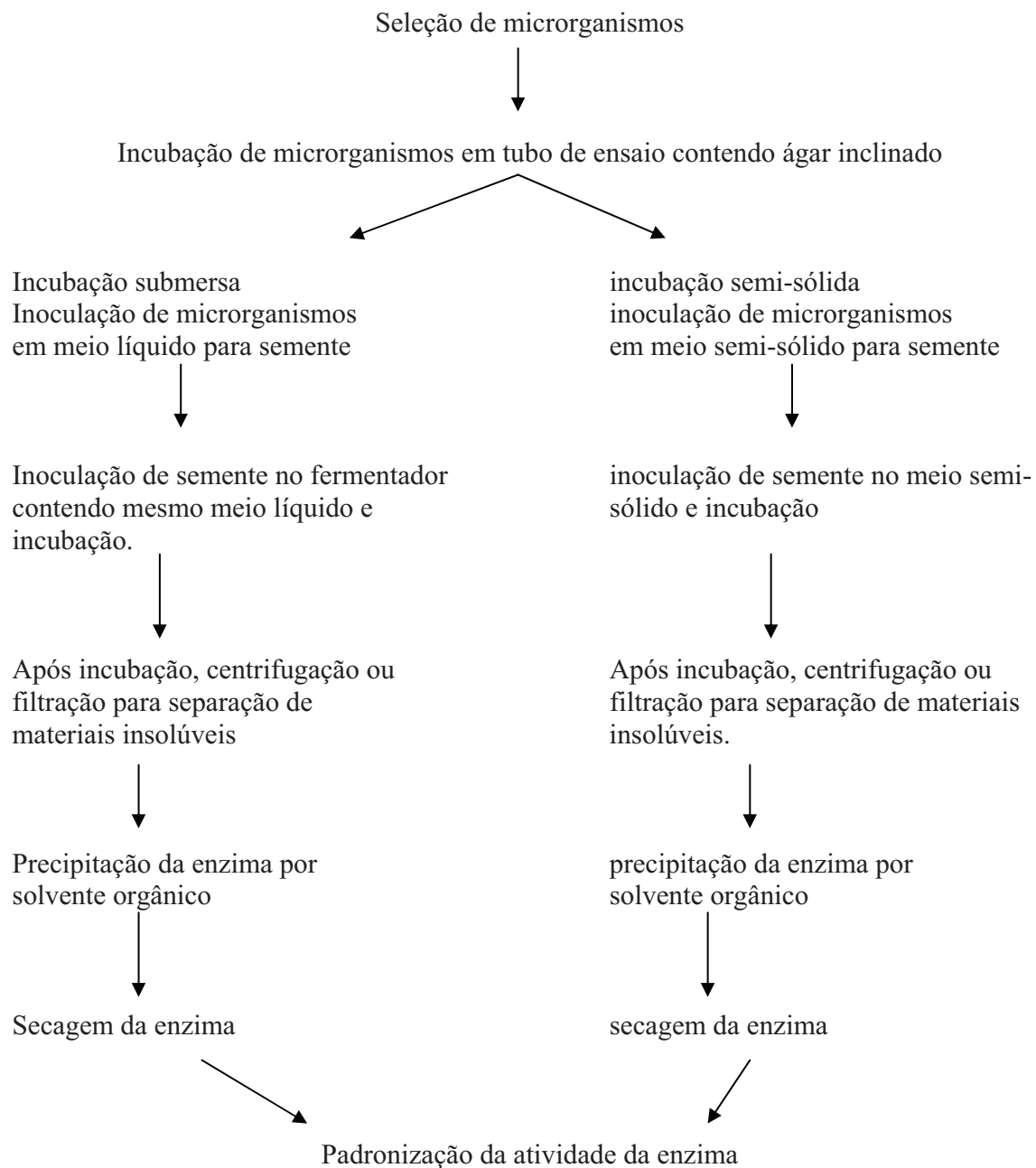


Figura 1: Produção de enzima microbiana (PARK, 1983). Adaptado por Mirela Roveda.

Segundo Maldonado (2006), a obtenção do inóculo é uma etapa de fundamental importância para se atingir bons níveis de atividade enzimática na fermentação e, também, para garantir a reprodutibilidade dos resultados. A utilização de fungos em fermentações torna a tarefa de reproduzir os resultados mais difíceis, pois o fato de serem organismos

pluricelulares faz com que padronização do inóculo seja mais complexa. É comum nestes casos a utilização da contagem de esporos em câmara de Newbauer para preparação do inóculo, no entanto, tal procedimento não garante necessariamente bons níveis de atividade enzimática na fermentação e nem uma boa reprodutibilidade dos resultados. Além da quantidade de esporos utilizados e a quantidade de inóculo, a composição do meio de cultivo, pH e tempo de incubação são outros fatores muito relevantes na obtenção de um inóculo capaz de levar a resultados satisfatórios e reprodutíveis no processo fermentativo.

Segundo Park (1983), cada linhagem de microrganismo produz um grande número de enzimas, mas a quantidade absoluta e relativa de várias enzimas individuais produzidas varia bastante de uma espécie para outra, e também entre linhagens de uma mesma espécie. Portanto, selecionam-se linhagens, para produção comercial de enzimas específicas, que tenham a capacidade de alta produção de enzima desejada. O processo de seleção consiste na escolha de culturas originais para produção da enzima, e na obtenção de novas linhagens de potencial mais alto. As culturas para seleção são obtidas na natureza, particularmente das fontes ricas em substrato, isto é, material no qual a enzima desejada deve agir. A seleção inicial pode ser realizada por plaqueamento das culturas em meio de ágar sólido contendo o substrato potencial. Essas linhagens são cultivadas como culturas puras no laboratório, e a seleção posterior é baseada em ensaios da potência da enzima produzida. Variando-se os constituintes do meio e as condições de produção, atinge-se o potencial máximo produtor da enzima desejada.

O número de enzimas produzidas por microrganismos atinge milhares, somente em número limitado tem-se atingido significado comercial. Quando se deseja obter uma enzima que efetue uma certa reação, deve-se procurá-la entre os microrganismos através de métodos apropriados de seleção. Frequentemente, a descrição taxonômica de microrganismos encontrados em trabalhos especializados como o *Manual de Bergey*, ou citações da literatura podem conduzir aos microrganismos adequados. Novas linhagens, isoladas de fontes naturais ricas em substâncias suscetíveis a ação da enzima também são ensaiadas por meio dos procedimentos de laboratório descritos, através dos quais se determinam tanto a quantidade máxima de enzima como os procedimentos adequados ao isolamento da enzima do meio de cultura. Finalmente, os métodos de isolamento e de

fermentação devem sofrer ampliação de escala, da instalação-piloto para uma escala industrial (PARK, 1983).

Segundo Malajovich (2004), as enzimas microbianas mostram uma grande versatilidade. Pode-se encontrar em diferentes organismos enzimas com propriedades distintas, cumprindo uma função semelhante. As condições ótimas de funcionamento diferem em cada um desses microrganismos, sendo respectivamente 40°C, 37°C e 55-60°C para a temperatura, e de 3,0-4,0; 7,2 e 6,6; para o pH. Segundo as condições do bioprocessamento, poderá ser escolhida uma ou outra.

Segundo Park (1983), têm sido encontradas culturas mutantes de microrganismos com uma capacidade de produção comercial de enzimas várias vezes maior que a capacidade das culturas originais. Frequentemente, os mutantes produzem menos enzimas e maior quantidade de produtos metabólicos indesejáveis, ou enzimas contaminantes. Isto dificulta o isolamento da enzima desejada e sua purificação. Os mutantes são obtidos submetendo-se as culturas a agentes mutagênicos, tais como luz ultravioleta, raios X, raios  $\gamma$  ou agentes químicos; sob tais condições, a maioria das células morre. As sobreviventes são então isoladas em substratos apropriados e, posteriormente, comparadas com as linhagens originais. Os microrganismos são cultivados por incubação de culturas puras em meios estéreis, de pH e composição nutritiva adequados, seguindo-se incubação à temperatura adequada, sob condições aeróbias ou anaeróbia. As enzimas comerciais são usualmente derivadas de microrganismos aeróbios.

Segundo Maldonado (2006), os reatores de mistura são muito empregados nos mais diversos tipos de processos biotecnológicos. Vários trabalhos na literatura procuram determinar as melhores condições de agitação e aeração para operação destes reatores, bem como influência de diferentes tipos de impulsores.

A otimização do processo industrial contempla o custo da matéria-prima, o tipo de fermentação (submersa ou em meio semi-sólido) e os controles necessários para o bom desenvolvimento do processo, como, por exemplo, o pH e a temperatura (MALAJOVICH 2004).

As lipases microbianas são produzidas em sua maior parte pela cultura submersa (ITO et al., 2001 apud SHARMA, 2002). Muitos estudos foram realizados para definir a ótima cultura e as exigências nutritivas para a produção de lipase pela cultura submersa. A



produção de lipase é influenciada pelo tipo e a concentração de fontes de carbono e de nitrogênio, o pH da cultura, a temperatura do cultivo, e a concentração de oxigênio dissolvida (ELIBOL E OZER, 2001 apud SHARMA, 2002). As fontes de carbono lipídica parecem ser geralmente essenciais para obtenção de um rendimento de lipase elevado; entretanto, alguns autores produziram bons rendimentos na ausência das gorduras e dos óleos.

Segundo Lima et al. (2001), a otimização de um meio de cultivo é também, em geral, um processo de progressivo aprimoramento. A influência de certos componentes do meio na produção da enzima-alvo pode ser muito significativa, eles devem conter fontes de carbono e energia, fontes de nitrogênio, substâncias minerais e fatores de crescimento.

Segundo Maldonado (2006), o estudo de meios industriais de fermentação para obtenção de produtos biotecnológicos tem sido de grande importância nos últimos anos. A busca por composições que levem a uma maior produção enzimática é um dos principais objetivos dos estudos realizados. No entanto, outros fatores ganharam importância significativa mais recentemente, como a necessidade da obtenção de composições com menor número de componentes, obtenção de atividades enzimáticas máximas em determinada condição, reaproveitamento de resíduos e outros biomateriais e principalmente, redução dos custos de produção.

A produção de lipase pode ser induzida pela adição de ácido oléico como fonte de carbono (LOTTI et al., 1998 apud SHARMA, 2002).

O uso de fontes não convencionais de carbono e nitrogênio vem crescendo nos últimos anos, como mostram muitos trabalhos. A água de maceração de milho, hidrolisados protéicos, resíduos ricos em açúcares, proteínas ou material oleoso estão entre os que mais freqüentemente são utilizados na produção de lipases (MALDONADO, 2006).

Miranda et al. (1999) estudaram a produção de lipase por *Penicillium citrinum* utilizando um resíduo do refinamento de óleo vegetal como indutor na produção. Foram utilizados meio de cultura com 1,0% de óleo de oliva e 0,75% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e outro com 1,6% do resíduo industrial e 0,75% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Os resultados obtidos foram comparados, sendo a atividade máxima obtida com a utilização do óleo de oliva de 2,63 U/mL e com o resíduo industrial, de 5,79 U/mL. Foi avaliada ainda a influência da fonte de nitrogênio e do pH inicial no meio utilizando o resíduo industrial. O sulfato de amônio na

concentração de 0,75% mostrou-se como a melhor fonte de nitrogênio obtendo-se uma atividade enzimática de 6,74 U/mL, com 1,6% de resíduo industrial no meio. O pH inicial do meio de 5,5 propiciou uma maior atividade enzimática de 5,26 U/mL, utilizando meio de cultura com 1,6% de resíduo industrial e 0,75% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Maldonado *et al.* (2001) investigaram a produção de lipase por *Penicillium restrictum* utilizando diferentes indutores para produção de lipase (óleo de oliva, de soja e de milho). Foi obtido a máxima atividade lipolítica de 23,0 U/mL, utilizando-se meio contendo 3,0% de peptona e 1,5% de óleo de milho, após 96 horas de fermentação. A fermentação foi realizada a 30° C, 160 rpm e pH inicial do meio de 5,5.

## 2.5 Fungos

Os fungos foram considerados vegetais durante muito tempo e, somente a partir de 1969, passaram a ser classificados em um reino à parte, denominado *Fungi* (TRABULSI *et al.*, 2000). Os fungos apresentam um conjunto de características que permitem sua diferenciação das plantas: não sintetizam clorofila nem qualquer pigmento fotossintético; não têm celulose na parede celular, exceto alguns fungos aquáticos, e não armazenam amido como substância de reserva. A presença de substâncias quitinosas na parede da maior parte das espécies fúngicas e a capacidade de armazenar glicogênio os assemelham às células animais (TRABULSI *et al.*, 2000).

Os fungos como as algas e os protozoários apresentam uma organização celular eucariótica, ou seja, o seu material genético está contido no núcleo e separado do citoplasma pela membrana nuclear (TRABULSI *et al.*, 2000). De acordo com Pelczar *et al.* (1996), os fungos não sintetizam o seu próprio alimento, sendo classificados como seres heterotróficos e mostram uma organização celular mais complexa com a presença de várias organelas. A dispersão dos fungos na natureza é feita por várias vias: animais, homem, insetos, água e, principalmente, pelo ar atmosférico, através dos ventos.

Os fungos são ubíquos, encontrando-se em vegetais, em animais, no homem, em detritos e em abundância no solo, participando ativamente do ciclo dos elementos na natureza. Eles são seres vivos eucarióticos, como as leveduras, ou multinucleados, como os

fungos filamentosos ou bolores e os cogumelos (fungos macroscópicos) (TRABULSI et al., 2000).

### **2.5.1 Estrutura da célula fúngica**

As células fúngicas são eucarióticas. Os fungos originam-se de uma única célula ou de um fragmento da hifa e estas unidades apresentam estruturas variadas, sendo que algumas delas, mais especificamente a parede celular, são de grande auxílio na taxonomia destes microrganismos (PELCZAR et al., 1996).

A parede celular dos fungos é uma estrutura rígida que protege a célula de choques osmóticos (possui até oito camadas e mede de 200 nm a 350 nm), sendo composta, de modo geral, por glucanas, mananas e, em menor quantidade, por quitina, proteínas e lipídios. A membrana plasmática atua como barreira semipermeável, no transporte ativo e passivo dos materiais, para dentro e para fora da célula, sendo constituída de uma porção hidrofóbica e de uma porção hidrofílica. As membranas das células dos fungos têm em sua composição química esteróis, que não são encontrados nas células bacterianas. O núcleo contém o genoma fúngico e está agrupado em cromossomos lineares, compostos de dupla fita de DNA arrumados em hélice. Dentro do núcleo encontra-se o nucléolo, um corpúsculo esférico contendo DNA, RNA e proteínas. Este corpúsculo é o sítio de produção do RNA ribossomal. Os ribossomos são sítios da síntese protéica, compostos por RNA e proteína e ocorrem dentro do citoplasma da célula. Na mitocôndria ocorre a fosforilação oxidativa, sendo a mesma composta por membranas de fosfolipídios. Possui membrana interna achatada (crista) e contém seu DNA e ribossomos próprios. O retículo endoplasmático é uma membrana em forma de rede que se encontra distribuída por toda célula fúngica. O complexo de Golgi é uma agregação interna de membranas, que está envolvida no armazenamento de substâncias que serão desprezadas pela célula fúngica. Os vacúolos estão relacionados com o armazenamento de substâncias de reserva para a célula, tais como o glicogênio e lipídios (TRABULSI et al., 2000).

### 2.5.2 Morfologia fúngica

Segundo Trabulsi et al. (2000), os fungos podem desenvolver-se em meios de cultivo especiais formando colônias de dois tipos: leveduriformes e filamentosas. As colônias leveduriformes são, de maneira geral, pastosas ou cremosas, lisas e brilhantes caracterizando o grupo das leveduras. As colônias filamentosas, que caracterizam os bolores, podem ser algodonosas, aveludadas ou pulverulentas, com os mais variados tipos de pigmentação. Cada hifa tem em torno de 5  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de largura e é formada pela reunião de muitas células. As paredes rígidas das hifas são formadas de quitinas, celulosas e glicanas. As hifas podem ser contínuas (não-septadas ou cenocíticas) ou septadas, conforme a Figura 2. Ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio. O micélio que se desenvolve no interior do substrato, como elemento de sustentação e de absorção de nutrientes, é chamado de micélio vegetativo. O micélio que se projeta na superfície e cresce acima do meio de cultivo é o micélio aéreo. Quando o micélio aéreo se diferencia para sustentar os corpos de frutificação ou propágulos, constitui o micélio reprodutivo.

O modo de reprodução dos fungos assume fundamental importância em sua caracterização morfológica, uma vez que diferentes tipos de reprodução traduzem-se em diferentes tipos morfológicos (TRABULSI et al., 2000).

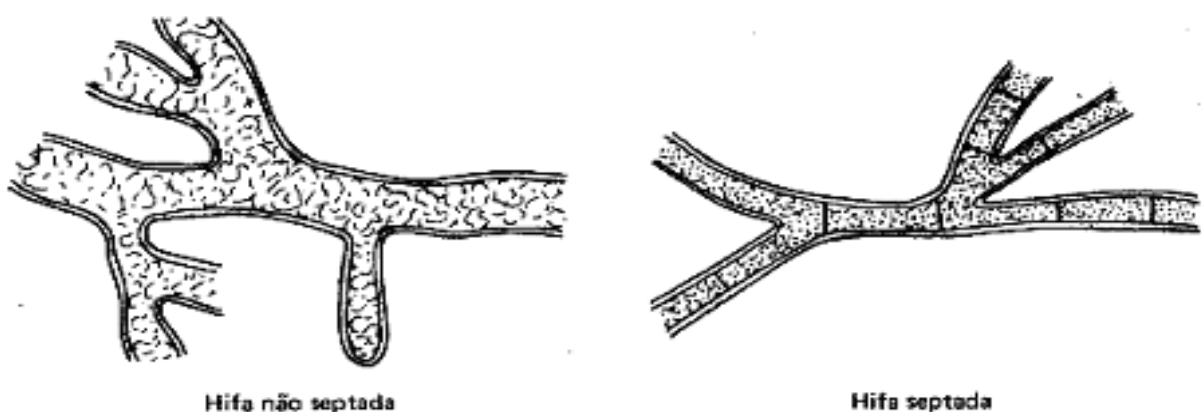


Figura 2 Estrutura de uma hifa não septada e de uma hifa septada.

### 2.5.3 Crescimento e necessidades nutritivas

O crescimento dos fungos é mais lento que o das bactérias, e suas culturas precisam, em média, de sete a quinze dias ou mais de incubação. A temperatura de crescimento abrange uma larga faixa, havendo espécies psicrófilas, mesófilas e termófilas. Os fungos podem ter morfologia diferente em função das condições nutricionais e da temperatura de seu desenvolvimento. A maioria dos fungos tolera uma ampla variação na concentração de íons de hidrogênio com pH ótimo em torno de 5,6 para o seu desenvolvimento. A pigmentação dos cultivos, muitas vezes, está relacionada com pH do substrato (TRABULSI et al., 2000).

No desenvolvimento vegetativo os fungos preferem a obscuridade ou luz difusa e, no desenvolvimento da parte reprodutiva, procuram a luz para a sua formação. A luz solar direta, geralmente, é um fator fungicida devido às radiações ultravioletas (PELCZAR et al., 1996).

Os organismos necessitam de uma variedade de elementos químicos como nutrientes, para crescerem. Estes elementos são necessários tanto para a síntese como para as funções normais dos componentes celulares (PELCZAR et al., 1996).

Os fungos, devido à ausência de clorofila, para se nutrirem, necessitam de substâncias orgânicas que eles próprios são incapazes de elaborar, sendo obrigados a viver em estado de saprofitismo, parasitismo ou simbiose. A nutrição da maioria dos fungos se dá por absorção, processo no qual enzimas adequadas hidrolisam macromoléculas, tornando-as assimiláveis através de mecanismos de transporte. As principais enzimas encontradas nos fungos são: lipases, invertases, lactases, amilases, proteinases etc. Há fungos que têm a capacidade de hidrolisar substâncias orgânicas complexas como quitina, osso, couro, inclusive materiais plásticos. Os fungos, como todos os seres vivos, necessitam de água para o seu desenvolvimento (TRABULSI et al., 2000).

As substâncias ou elementos retirados do ambiente e usados para construir novos componentes são chamados nutrientes. Os nutrientes podem ser divididos em duas classes: macronutrientes e micronutrientes. Ambos os tipos são imprescindíveis, mas os primeiros são necessários em grandes quantidades por serem os principais constituintes dos compostos orgânicos celulares. Os macronutrientes incluem carbono, oxigênio, hidrogênio, nitrogênio, fósforo e enxofre e totalizam cerca de 90 % da composição celular. Os demais

10 % são constituídos pelos micronutrientes: potássio, cálcio, ferro e magnésio (BARBOSA; TORRES, 1998).

#### **2.5.4 Metabolismo**

De acordo com Lehninger et al. (2000), o metabolismo é uma atividade celular altamente dirigida e coordenada na qual muitos sistemas multienzimáticos cooperam para realizar quatro funções básicas:

- a) obter energia química quer a partir da energia solar capturada, quer pela degradação de nutrientes obtidos do meio ambiente e ricos em energia;
- b) converter as moléculas dos nutrientes, também em moléculas características da própria célula, incluindo precursores macromoleculares;
- c) polimerizar precursores monoméricos em proteínas, ácidos nucleicos, lipídios, polissacarídeos e outros compostos celulares;
- d) sintetizar e degradar as biomoléculas necessárias em funções celulares especializadas.

Segundo Pelczar et al. (1996), os fungos obtêm energia através da degradação, que consiste na quebra de nutrientes ou substâncias químicas. Durante o catabolismo a energia é liberada das moléculas nutrientes e é armazenada temporariamente em um sistema de armazenamento de energia até sua utilização. O sistema de armazenamento de energia também serve como um sistema de transferência de energia, quando ela é necessária para a síntese dos constituintes da célula. O catabolismo das moléculas nutrientes também fornece as unidades básicas a partir dos quais os constituintes da célula podem ser sintetizados. Ainda que os processos de degradação e síntese sejam opostos, eles são interativos e processados concomitantemente na célula microbiana. Os microrganismos que obtêm a energia necessária a partir de nutrientes orgânicos, devem primeiro decompor o nutriente em compostos que possam ser utilizados para a síntese de ATP. Isto é feito por uma série de reações consecutivas, catalisadas por enzimas, que consistem no catabolismo.

A glicose, além de ser fonte de energia para o metabolismo, é um precursor capaz de suprir uma gama de intermediários metabólicos que são os materiais primários necessários para as reações biossintéticas. A partir da glicose, os microrganismos podem obter os esqueletos carbônicos para a síntese de aminoácidos, nucleotídeos, coenzimas, ácidos

graxos e outros intermediários metabólicos necessários para o seu crescimento e multiplicação (LEHNINGER et al., 2000).

A via de degradação da glicose é a glicólise, formada por duas fases, compostas por dez etapas enzimáticas em que uma molécula de glicose é degradada em uma série de reações catalisadas por enzimas para liberar duas moléculas de piruvato (PELCZAR et al., 1996).

O piruvato formado pela glicólise pode tomar três rotas catabólicas alternativas. Nos organismos aeróbicos, segundo Lehninger et (2000), como é o caso dos fungos filamentosos de interesse neste projeto, a glicólise constitui apenas o primeiro estágio da degradação completa da glicose. O piruvato é oxidado, com perda do seu grupo carboxila como  $\text{CO}_2$ , para liberar o grupo acetila da acetil-coenzima A, a qual é então totalmente oxidada a  $\text{CO}_2$  pelo ciclo do ácido cítrico (oito etapas enzimáticas, com finalidade de potencialização de energia, através da transferência de elétrons). Os elétrons originados dessas oxidações são passados para o  $\text{O}_2$  através de uma cadeia de transportadores na mitocôndria, formando  $\text{H}_2\text{O}$ . A energia liberada nas reações de transferência de elétrons permite a síntese de ATP nas mitocôndrias (LEHNINGER et al., 2000).

A segunda rota para o metabolismo do piruvato é a sua redução a lactato através da chamada via da fermentação do ácido láctico, que é o produto da glicólise sob condições anaeróbicas nos microrganismos que realizam a fermentação láctica. A terceira rota principal do metabolismo do piruvato leva ao etanol. Em certos microrganismos, como a levedura da fabricação da cerveja, o piruvato é convertido anaerobicamente em etanol e  $\text{CO}_2$ , um processo chamado de fermentação alcoólica (LEHNINGER et al., 2000).

### **2.5.5 Taxonomia fúngica**

A classificação dos fungos baseia-se primariamente nos seguintes critérios:

- a) características dos esporos sexuais e corpos de frutificação presentes durante os estágios sexuais dos seus ciclos de vida;
- b) natureza dos ciclos de vida;
- c) características morfológicas do micélio vegetativo ou das células (PELCZAR et al., 1996).

Muitos fungos produzem esporos sexuais e corpos de frutificação somente sob certas condições ambientais. Os micologistas dividem o reino *Fungi* em três principais grupos: os fungos limosos, os fungos inferiores flagelados e os fungos terrestres. Os fungos de interesse neste projeto de pesquisa são os fungos terrestres, os quais são abordados a seguir. Este grupo inclui leveduras, bolores, orelhas-de-pau, mofos, fungos em forma de taça, ferrugem, carvão e cogumelos. Todos caracterizam-se pela nutrição através da absorção, e com exceção das leveduras (que são geralmente unicelulares), a maioria produz um micélio bem desenvolvido constituído de hifas septadas ou cenocíticas (PELCZAR et al., 1996).

De acordo com Pelczar et al. (1996), existem quatro principais grupos de fungos terrestres são os *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* e *Deuteromycetes*.

## 2.6 Efluentes de laticínios

Os laticínios representam um importante setor da indústria alimentícia, tanto do ponto de vista econômico quanto social. Entretanto, considerado o grande número de empresas que lançam seus efluentes sem nenhum tipo de tratamento nos cursos d'água, a contribuição dessas indústrias, em termos de poluição hídrica, principalmente com relação à carga orgânica, é bastante significativa. O problema agrava-se se for considerado que 90% dos laticínios em funcionamento, são de pequeno e médio portes, não possuindo quadro qualificado para lidar com as mudanças necessárias à implementação de tecnologias limpas e com a operação de sistemas de tratamento (MENDES, 2003).

As águas residuárias de laticínios são formadas de leite e seus derivados diluídos, detergentes, sanitizantes, lubrificantes e outros produtos químicos. Por apresentar conteúdo basicamente orgânico, este tipo de efluente é apropriado ao tratamento biológico (SÁ, 1997).

A indústria de laticínios produz diferentes produtos como leite pasteurizado, leite condensado, leite desnatado e leite em pó, iogurte, manteiga, diferentes tipos de sobremesas e queijos e algumas vezes soro do queijo (VIDAL et al., 2000 apud MENDES, 2005).

Os efluentes de indústrias de laticínios são geralmente produzidos de uma maneira intermitente, e a vazão e as características mudam de uma fábrica para outra dependendo do tipo de sistemas e os métodos de operações (VIDAL et al., 2000 apud MENDES, 2005).



Na indústria de laticínios ocorre a geração de efluente carregado de matéria orgânica (resíduos de leite diluído em quantidades variáveis e seus derivados processados), de uma variedade de fontes detergentes, desinfetantes, lubrificantes e de esgoto doméstico. A quantidade e a carga poluente das águas residuárias variam bastante, dependendo, sobretudo da água utilizada, do tipo de processo e do controle exercido sobre as várias descargas de resíduos (BRAILE e CAVALCANTI, 1993 apud BRIÃO, 2000).

A qualidade dos efluentes varia em função dos produtos industrializados (resfriamento e ensacamento, fabricação de queijos, iogurtes, manteiga, requeijão, leite em pó, entre outros.), capacidade de produção, *lay-out* industrial, tecnologia utilizada para a higienização das instalações e qualidade do leite utilizado (GIORDANO, 2004).

Os efluentes brutos apresentam uma rápida alteração do pH devido à fermentação láctica, o que deve ser considerado em relação aos materiais empregados na execução do sistema de tratamento (BRAILE; CAVALCANTI, 1993).

Os efluentes de indústrias de laticínios contêm muita lactose e quando feito um tratamento biológico, reduz-se consideravelmente a quantidade presente deste açúcar. (BRAILE; CAVALCANTI, 1993; METCALF & EDDY, 1991).

Os lipídeos e proteínas contidos nos efluentes de indústrias alimentícias são lentamente biodegradados. Além disso, a baixas temperaturas, os lipídeos solidificam, causando problemas de colmatação nos reatores e desenvolvendo odores desagradáveis (TEIXEIRA, 2001).

A fração de lipídios dos efluentes é caracterizada por óleos, graxas, gordura e ácidos graxos livres e, juntamente com proteínas e carboidratos compõem os principais compostos orgânicos de água residuárias de diversas indústrias de alimentos. Lipídios são compostos que causam grandes danos ao meio ambiente, como a formação de filmes de óleos nas superfícies aquáticas, impedindo a difusão de oxigênio do ar para esse meio e o mais importante, promovendo a mortandade da vida aquática (CASTRO; MENDES, 2005).

Os lipídios impedem a adsorção de ácidos graxos na superfície celular causando flotação da biomassa e impedindo a formação de grânulos de lodo em reatores anaeróbios do tipo UASB (GAVALA et al., 1999; HWU et al., 1998 apud Mendes, 2003)

A hidrólise de lipídeos é uma etapa limitante na digestão anaeróbia de sólidos, presentes em diversos tipos de efluentes devido ao baixo consumo de ácidos graxos de cadeia longa pelas bactérias e à necessidade de uma pequena concentração de hidrogênio ( $H_2$ ), formado nas reações de encurtamento da cadeia carbônica dos AGCL (ácidos graxos de cadeia longa). O acúmulo deste gás pode afetar o equilíbrio das reações de decomposição dos AGCL que são termodinamicamente desfavoráveis (MENDES, 2005).

As principais fontes de geração de lipídeos são indústrias de óleos comestíveis, sorvetes, laticínios, curtumes, matadouros e os efluentes domésticos e de restaurantes, principalmente de “fast food” (MENDES, 2005).

Os contaminantes orgânicos tais como gorduras, encontram-se entre as maiores fontes de contaminação do solo e das águas superficiais e subterrâneas. Produzidas a partir de diversas atividades industriais, estas gorduras estão presentes em quantidades significativas em vários efluentes, como por exemplo, os gerados por indústrias de processamento de alimentos, de cosméticos e restaurantes em geral. Por apresentar baixa degradabilidade na natureza, a gordura acumulada no meio ambiente tem sido objetivo de constantes pesquisas, como desenvolvimento de tecnologias que visem um equilíbrio entre o binômio custo versus eficiência de remoção (VEIGA, 2003).

O objetivo do tratamento de efluentes é reduzir o seu impacto adverso no meio ambiente (flora e fauna). O sucesso de qualquer tratamento incluindo a bioremediação depende da escolha de um agente adequado, do local correto com as condições ambientais corretas (MISHRA, 2000).

Segundo Thassitou e Arvanitoyannis (2001), as indústrias de laticínios contribuem substancialmente para a poluição da superfície da água e do solo. Os principais resíduos destas indústrias são resíduos líquidos quimicamente modificados. As principais características dos resíduos de laticínios são:

- a) carga orgânica elevada (substâncias gordurosas, etc.);
- b) grandes variação de desperdício na fonte;
- c) variações consideráveis no pH (4,2 – 9,2);
- d) carga de sólidos suspensos (SS) relativamente alta (400mg/L a 2000mg/L).

Os resíduos de água dos laticínios podem conter proteínas, sais, substâncias gordurosas, lactose e outros tipos de produtos químicos de limpeza. Os detergentes representam a maior quantidade de produtos químicos usados em laticínios (THASSITOU; ARVANITTOYANNIS, 2001).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Caracterização do efluente

A caracterização do efluente foi realizada em dois pontos do sistema de tratamento de efluentes de uma indústria de laticínios da Região de Passo Fundo. O primeiro ponto foi na saída do equalizador (P3) e o segundo na saída do primeiro tanque de aeração (P6).

Os pontos foram escolhidos pela diferença de concentração de óleos e graxas entre os mesmos. A saída do equalizador caracteriza-se por grande concentração de óleos e graxas, enquanto na saída do tanque de aeração a concentração de óleos e graxas é menor devido o efluente já ter sofrido várias etapas do tratamento.

A Figura 3 apresenta o fluxograma da estação de tratamento da indústria de laticínios.

As Figuras 4 e 5 apresentam as fotos do equalizador e do aerador da ETE da indústria de laticínios.

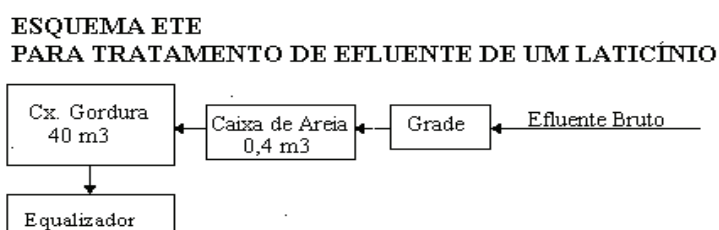


Figura 3: Fluxograma da ETE para o tratamento de efluente de laticínios

Fonte: Adriana Schimitt\*



Fonte: Adriana Schimitt\*

Figura 4: Foto do equalizador da ETE da indústria de laticínios.

\* Funcionária da indústria de laticínios.



Fonte: Adriana Schimitt\*.

Figura 5: Foto do tanque de aeração da ETE da indústria de laticínios.

A caracterização do efluente foram determinados os seguintes parâmetros: DQO, DBO, nitrogênio amoniacal total, fósforo e óleo e gorduras.

### **3.1.1 Determinação da DQO (Demanda química de oxigênio)**

A análise de DQO foi realizada em refluxo fechado de acordo com a metodologia descrita pelo Standard Methods (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1995) com amostras do efluente de laticínios coletado nas saídas do equalizador (P3) e do aerador (P6). O método baseia-se no princípio da colorimetria a 600 nm pela oxidação da matéria orgânica por uma mistura de dicromato e ácido sulfúrico. Quando uma amostra é digerida, o íon dicromato oxida a matéria orgânica da amostra sob refluxo fechado. Isto resulta na mudança do cromo do estado hexavalente ao estado trivalente. Ambas espécies do cromo são coloridas e absorvidas na região visível do espectro. O íon do dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) é absorvido fortemente na região 400 nm, onde a absorção do íon cromo ( $\text{Cr}^{3+}$ ) é muito menor. O íon dicromato é fortemente absorvido na região de 600 nanômetros, onde o dicromato tem uma absorção de quase zero. Para valores de DQO entre 100 e 900 mg/L, o aumento do  $\text{Cr}^{3+}$  dever ser determinado na região de 600 nm.

### **3.1.2 Determinação da DBO (Demanda bioquímica de oxigênio)**

A análise de DBO foi realizada com o efluente de laticínios coletado na saída do equalizador (P3) e na saída do aerador (P6) através da metodologia descrita pelo Standard Methods (American Public Health Association, 1995). O método baseia-se no princípio da volumetria e é realizado pela diferença entre os valores de concentração de oxigênio dissolvido de uma amostra de efluente incubada por 5 d a 20°C, sendo a diferença atribuída ao consumo do oxigênio pelos microrganismos presentes na amostra. O oxigênio dissolvido é medido inicialmente e após a incubação, e a DBO é computada da diferença entre o oxigênio inicial e o final. Como a demanda de oxigênio inicial será determinada logo depois feita à diluição, toda a percepção de oxigênio que ocorre depois desta medida é incluída na medida da DBO.

### **3.1.3 – Nitrogênio amoniacal total**

A determinação da concentração de nitrogênio amoniacal total foi feita com o efluente de laticínios dos pontos selecionados de acordo com a metodologia descrita pelo Standard Methods (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1995). O método baseia-se na digestão das amostras com ácido sulfúrico e sulfato de cobre como catalisador. A amostra digerida é destilada por arraste de vapor, sob a forma de nitrogênio amoniacal, obtida por deslocamento com hidróxido de sódio. A amônia recolhida em solução fraca de ácido bórico é titulada com solução de ácido sulfúrico, o que determina a quantidade de nitrogênio amoniacal total da amostra.

### **3.1.4 – Fósforo**

A determinação da concentração de fósforo foi feita com o efluente de laticínios dos pontos selecionados de acordo com a metodologia descrita pelo Standard Methods (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1995). O método baseia-se na conversão do fósforo (orto-fosfato) pelo calor, pela radiação ultravioleta e pela digestão com persulfato. Ao mesmo tempo, os poli-fosfatos inorgânicos são convertidos em orto-fosfatos por digestão pelo ácido sulfúrico. O molibdato de amônia e o tartarato de potássio e antimônio reagem em meio ácido com o orto-fosfato para formar o ácido heteropolifosfomolibdênico que será reduzido intensivamente a molibdênio, colorido de azul pelo ácido ascórbico. A concentração de fósforo foi obtida através da leitura da amostra em espectrofotômetro a 880 nm.

### **3.1.5 – Óleos e Graxas**

A concentração de óleos e graxas foram determinadas com o efluente de laticínios dos pontos selecionados de acordo com a metodologia descrita pelo Standard Methods (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1995). O método baseia-se na extração de lipídios da amostra através do uso de hexano como solvente. Qualquer óleo sólido ou graxa viscosas presente são separadas das amostras líquidas por filtração. Após a extração em aparelho de Soxhlet com solvente, o resíduo restante após a evaporação do solvente é pesado para determinar o índice do óleo e graxas. Os compostos volatilizados ou abaixo de 103°C serão perdidos quando o filtro é seco.

### **3.2 Isolamento de microrganismos**

O isolamento de microrganismos foi realizado através da semeadura direta do efluente obtido dos pontos selecionados em meio de cultivo apropriado para o crescimento de fungos. Para tanto, foram adicionados 0,3 mL de amostra de efluente dos pontos de coleta em placas de Petri contendo meio ágar dextrose batata (PDA) acidificado com ácido tartárico a 10%, realizando-se o espalhamento com uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 30°C durante 5 d. A seqüência do isolamento foi realizada através da técnica de esgotamento por estrias.

Os microrganismos isolados foram mantidos em tubos de ensaio contendo o meio PDA a 4°C.

#### **3.2.1 Identificação dos fungos através de microcultivos**

Os fungos isolados foram identificados quanto ao gênero através da realização de microcultivos.

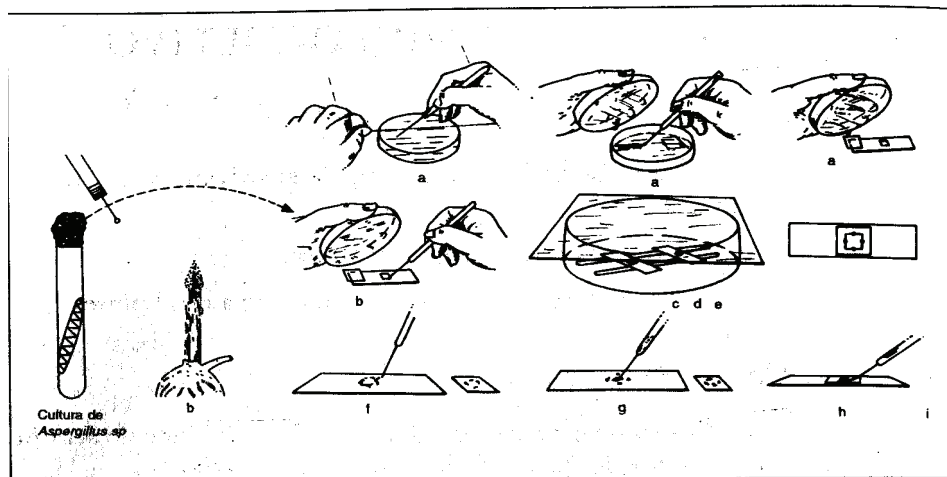
O preparo do microcultivo foi realizado em uma placa de Petri esterilizada, contendo papel filtro no fundo e, sobre este, um bastão de vidro em “U”, junto com uma lâmina e uma lamínula. A técnica seguiu os seguintes passos:

- a) foi cortado um quadrado de 5 mm de ágar Saboraud e transportado com uma alça de platina, sobre a lâmina;



- b) foram retirados pequenas porções de colônia que foram semeada em dois lados do quadrado de ágar Saboraud;
- c) o cultivo foi coberto com a lamínula;
- d) o papel filtro foi umedecido com água destilada estéril para que a placa funcione como uma câmara úmida;
- e) a placa foi identificada e colocada na estufa a 20°C, onde foi observado diariamente o crescimento da cultura;
- f) quando o crescimento foi suficiente, foi retirada a lamínula, observando a lâmina para que o quadrado não deslize. Este quadrado ficou aderido na lâmina ou lamínula, por isso, deve ser retirado com o auxílio de uma pinça e colocado em um recipiente com desinfetante;
- g) as faces da lâmina ou lamínula que estavam em contato com o quadrado e foram montadas a lâmina e a lamínula separadamente em lactofenol azul-algodão e fechadas com esmalte incolor.

A Figura 6 apresenta a técnica de microcultivo detalhadamente.



Fonte: Ribeiro et al, 2001.

Figura 6 - Técnica para microcultivo para estudo microscópico dos fungos.

As estruturas microscópicas foram analisadas e comparadas em Atlas para identificação do fungo, garantido que diferentes espécies fossem isoladas para posterior seleção dos fungos produtores de lipase.

### 3.3 Seleção de microrganismos produtores de lipases

Os microrganismos isolados na etapa anterior foram testados quanto a habilidade de crescimento em meios contendo óleos vegetais. Os microrganismos foram cultivados em meio PDA adicionado de azeite de oliva a 5%.

A inoculação foi realizada pontualmente no centro das placas de Petri contendo o meio de cultivo. Foi preparada uma suspensão de esporos com ágar 0,1% e realizada a inoculação com um micropipetador de 0,2 µL, a fim de evitar o espalhamento dos esporos sobre a superfície do meio. Os cultivos foram mantidos em estufa a 30°C por 144 horas.

As placas foram marcadas a fim de se realizar a medida do raio das colônias em seis pontos ao longo da circunferência das mesmas. As medidas dos raios foram realizadas a cada 24 h através do uso de um paquímetro. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A velocidade de crescimento radial foi calculada através da regressão linear dos dados de raio das colônias versus tempo, segundo a Equação 1.

$$r(cm) = VCR.t + b \quad (1)$$

Os dados de VCR dos fungos foram analisados através de Anova e Teste de Tukey para comparação de médias.

### **3.4 Produção de lipases via Fermentação Submersa**

#### **3.4.1 Microrganismos**

Os microrganismos selecionados no item 3.3 foram utilizados para a produção de lipases via fermentação submersa.

#### **3.4.2 Preparo do inóculo**

O preparo dos inóculos foi realizado em placas de petri contendo o meio PDA utilizando os fungos que apresentaram maiores velocidades de crescimento radial. O inóculo foi incubado durante 7 d em estufa a 30°C. Após o crescimento, foi preparada uma solução de esporos através da adição de 20 mL de uma solução 0,2 % de Tween 80, seguida de raspagem dos esporos com uma alça de Drigalsky e filtração em gaze estéril para retenção das hifas. A inoculação dos meios foi realizada adicionando-se 5 mL de solução de esporos para cada 200 mL de meio de cultivo.

### 3.4.3 Meio de cultivo e condições experimentais

O meio de cultivo utilizado nas fermentações foi o efluente de laticínios coletado na saída do equalizador e na saída do aerador acrescidos dos nutrientes: nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) 0,1%, fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,1%, sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0,05% e azeite de oliva como indutor. O pH foi ajustado à 6,5 com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1,5 M.

Os experimentos foram realizados em duplicata em erlenmeyers de 500 mL, com volume inicial de meio de 200 mL e mantidos em agitador orbital a 30 °C por 4 d, com agitação de 130 rpm. Amostras de 10 mL foram coletadas no tempo inicial e a cada 24 h, para avaliação da atividade lipásica da fermentação.

### 3.4.4 Atividade lipásica

Para a determinação da atividade lipolítica em amostras líquidas, foi feita a extração da lipase produzida. O método consistiu em retirar 10 mL de solução dos erlenmeyers e filtrar para a retenção dos sólidos.

Na determinação da atividade lipolítica foi adotado o método descrito por Burkert et al. (2004), que é baseado na titulação com  $\text{NaOH}$   $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase presente no extrato enzimático da fermentação, sobre os triacilglicerídeos do óleo de oliva emulsionados em goma arábica. Em frascos de 125 mL foram adicionados 2 mL de tampão fosfato 10 mmol/L com pH 7,0 e 5 mL de emulsão de azeite de oliva (75 % de solução de goma arábica 7 % e 25 % de azeite de oliva). A este sistema foi adicionado 1 mL de extrato enzimático da fermentação e incubado a 37°C por 30 min a 160 rpm. Após a incubação a reação foi paralisada pela adição de 15 mL de solução acetona:etanol:água 1:1:1 v/v e os ácido graxos liberados titulados com uma solução de  $\text{NaOH}$   $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ , utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto por mL de meio fermentado, nas condições do ensaio (BURKERT et al., 2004). As determinações de atividade lipolítica foram realizadas em duplicata.

A produtividade enzimática máxima foi calculada através da equação 2:

$$P_E = \frac{A_{EMax} - A_{ET0}}{t} \quad (2)$$

$P_E$  = produtividade enzimática

$A_{EMax}$  = atividade enzimática máxima

$A_{ET0}$  = atividade enzimática tempo zero

$t$  = tempo

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização do efluente

As Tabelas 2 e 3 apresentam os resultados obtidos na caracterização do efluente de laticínios. A variabilidade dos resultados de DBO, DQO, NTK, fósforo e óleos e graxas nas análises físico-químicas ocorrem pelo fato delas dependerem da produção diária do laticínio estudado, e principalmente pelos pontos de coleta utilizados serem localizados em pontos bem distintos da estação de tratamento, a saída do equalizador, localizada no início do processo de tratamento e a saída do aerador, localizada no final do processo já tendo ocorrido à degradação da matéria orgânica do efluente.

Tabela 2: Caracterização do efluente de laticínios na saída do equalizador (P3) quanto aos parâmetros de DQO, nitrogênio amoniacal total, fósforo total e óleos e graxas.

Parâmetros	Concentração (mg/L)				
	Mínimo	Máximo	Média	DP**	CV***
DQO*	803,27	4975,95	1740,86	222,87	10,75
Nitrogênio amoniacal total	0,50	12,32	5,00	2,73	54,66
Fósforo Total	0,16	0,55	0,33	0,06	16,49
Óleos e Graxas	0,01	4,40	1,89	0,38	20,26

\* DQO: Demanda química de oxigênio; \*\* DV: Desvio padrão; \*\*\* CV: Coeficiente de variação ( $DP/média \times 100$ )

Tabela 3: Caracterização do efluente de laticínios na saída do tanque de aeração (P6) quanto aos parâmetros de DQO, nitrogênio amoniacal total, fósforo total e óleos e graxas.

Parâmetros	Concentração (mg/L)				
	Mínimo	Máximo	Média	DP**	CV***
DQO*	76,58	2810,22	534,64	48,33	23,02
Nitrogênio amoniacoal total	1,01	35,62	6,91	3,78	54,73
Fósforo Total	0,06	0,32	0,22	0,04	16,33
Óleos e Graxas	0	5,31	1,81	0,67	37,07

\* DQO: Demanda química de oxigênio; \*\* DV: Desvio padrão; \*\*\* CV: Coeficiente de variação ( $DP/média \times 100$ )

A DQO média na saída do equalizador foi de 1740,86 mg/L  $\pm$  222,87 mg/L e na saída do aerador de 534,64  $\pm$  48,33 mg/L, sendo estes valores significativamente diferentes ( $p=0,0120$ ) a um nível de significância de 5%. A diminuição da DQO na saída do aerador em relação com a saída do equalizador foi menor e isso indicou que o tratamento está sendo eficiente.

Segundo Poester e Leitão (1989), a DBO e DQO dos despejos de laticínios variam muito em função do produto fabricado, já que diferentes quantidades de oxigênio são necessárias para a oxidação de diferentes constituintes do leite, tais como gordura, carboidratos e proteínas.

A concentração de nitrogênio amoniacoal total não variou de um ponto de coleta para outro ( $p = 0,6711$ ). Na saída do equalizador obteve-se 5,00 mg/L  $\pm$  2,73 mg/L de nitrogênio amoniacoal total; na saída do aerador o nitrogênio amoniacoal total foi de 6,91 mg/L  $\pm$  3,78 mg/L. A Fundação Estadual de Proteção Ambiental exige que indústrias de laticínios emitam concentrações de nitrogênio totais menor que 10,0 mg/L em seus resíduos líquidos.

A concentração de fósforo total na saída do equalizador foi de 0,33 mg/L  $\pm$  0,06 mg/L. Na saída do aerador obtiveram-se valores de concentração de fósforo total de 0,22 mg/L  $\pm$  0,04 mg/L, observando-se que o valor da concentração de fósforo total diminuiu do equalizador para o aerador, confirmando o bom funcionamento do tratamento. A análise dos dados de fósforo através do Teste de Tukey demonstrou diferença significativa ( $p = 0,027$ ) entre os valores obtidos nas saídas do equalizador e aerador. A Fundação Estadual de Proteção Ambiental tem como parâmetro de controle a emissão de efluentes industriais com no máximo, 1,0 mg/L de fósforo para resíduos líquidos.

A concentração de óleos e graxas na saída do equalizador foi de 1,89 mg/L  $\pm$  0,38 mg/L. Na saída do aerador obteve-se 1,81 mg/L  $\pm$  0,67 mg/L de óleos e graxas, não havendo

diferença significativa entre estes valores ( $p = 0,9185$ ). Segundo a portaria nº 128/2006 – SSMA a concentração de óleos e graxas permitidas em efluentes líquidos é  $\leq 30$  mg/L em óleos e graxas de origem vegetal ou animal e de  $\leq 10$  mg/L em óleos e graxas de origem mineral.

A DBO na saída do equalizador foi de 452,0 mg/L; enquanto que na saída do aerador foi de 255,3 mg/L demonstrando que os microrganismos existentes neste efluente degradaram matéria orgânica na etapa de aeração, ou seja, no tratamento biológico do efluente.

#### 4.2 Isolamento e seleção de microrganismos

A quantidade de fungos isolamentos foi de 21 fungos a partir do efluente de laticínios utilizado (denominados fungos E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, E19, E20 e E21). A realização dos microcultivos possibilitou identificar os fungos isolados através da análise microscópica dos micélios. Os fungos E6, E7, E8, E9, E10, E15, E17 e E21 foram identificados como do gênero *Aspergillus*; os fungos E3, E12, e E20 como *Penicillium*; os fungos E2, E13, E18 e E19 como *Trichoderma*, os fungos E1, E4, E5 e E14 como *Fusarium* e o fungo E16 não foi identificado.

Os fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Trichoderma* foram isolados a partir do efluente.

A Tabela 4 apresenta a classificação dos 21 fungos encontrados na fase de isolamento.

Tabela 4: Identificação dos fungos quanto ao gênero através de microcultivos

Fungo	Gênero	Ponto de isolamento
E <sub>1</sub>	<i>Fusarium</i>	P3
E <sub>2</sub>	<i>Trichoderma</i>	P3
E <sub>3</sub>	<i>Penicillium</i>	P6
E <sub>4</sub>	<i>Fusarium</i>	P3
E <sub>5</sub>	<i>Fusarium</i>	P3
E <sub>6</sub>	<i>Aspergillus</i>	P6
E <sub>7</sub>	<i>Aspergillus</i>	P3
E <sub>8</sub>	<i>Aspergillus</i>	P3
E <sub>9</sub>	<i>Aspergillus</i>	P6
E <sub>10</sub>	<i>Aspergillus</i>	P6

E <sub>11</sub>	Levedura	P3
E <sub>12</sub>	<i>Penicillium</i>	P6
E <sub>13</sub>	<i>Trichoderma</i>	P6
E <sub>14</sub>	<i>Fusarium</i>	P3
E <sub>15</sub>	<i>Aspergillus</i>	P6
E <sub>16</sub>	Não identificado	P3
E <sub>17</sub>	<i>Aspergillus</i>	P6
E <sub>18</sub>	<i>Trichoderma</i>	P6
E <sub>19</sub>	<i>Trichoderma</i>	P3
E <sub>20</sub>	<i>Penicillium</i>	P6
E <sub>21</sub>	<i>Aspergillus</i>	P6

As Figuras 7 a 10 apresentam microfotografias da estrutura dos fungos isolados na etapa de microcultivo, nos pontos analisados.

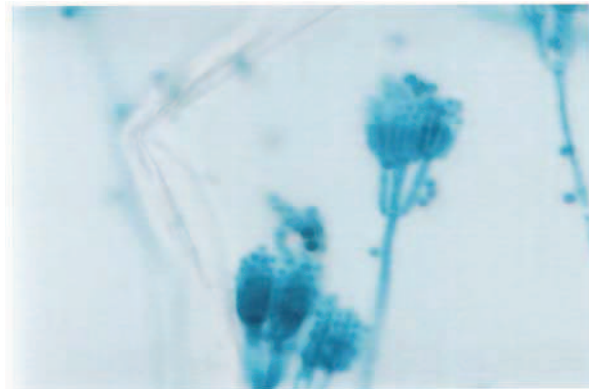


Figura 7: Estrutura do fungo *Penicillium* (E3) isolado do efluente de laticínios.



Figura 8: Estrutura do fungo *Aspergillus* (E6) isolado do efluente de laticínios



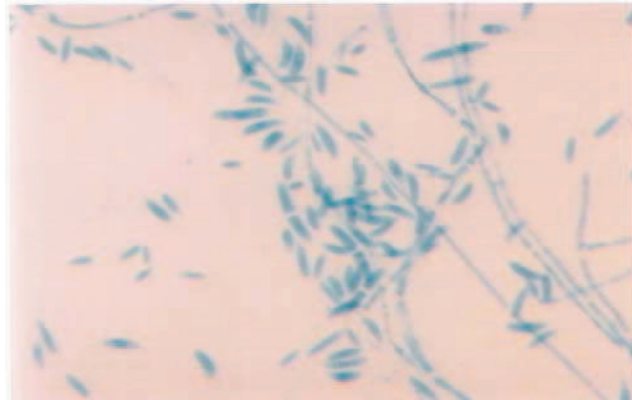


Figura 9: Estrutura do fungo *Fusarium* (E5) isolado do efluente de laticínios.

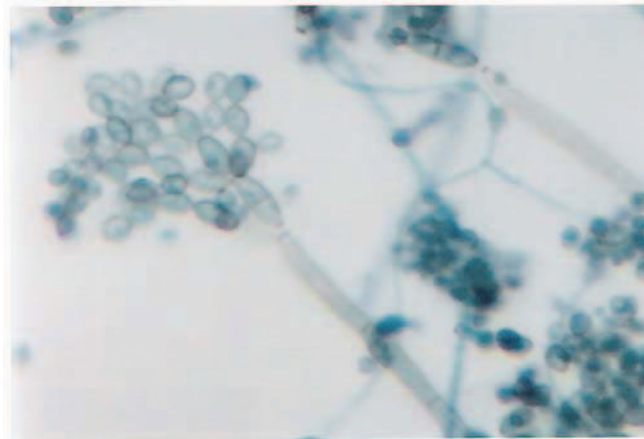


Figura 10: Estrutura do fungo *Trichoderma* (E19) isolado do efluente de laticínios.

#### 4.3 Seleção de microrganismos produtores de lipases

A Tabela 5 apresenta as velocidades de crescimento radial para os fungos isolados do efluente de laticínios, cultivados em PDA adicionado de 5% de azeite de oliva.

As velocidades de crescimento radial (VCR) são o coeficiente angular da reta obtida a partir da regressão linear dos raios das colônias em função do tempo, portanto, quanto maior a inclinação da reta, maior é a velocidade de crescimento radial, maior o potencial de crescimento do fungo e o potencial de degradação da fonte de carbono.

As VCR dos fungos isolados do efluente de laticínios foram analisados através da Anova, sendo observadas diferenças significativas entre os resultados obtidos pelos diferentes fungos ( $p < 0,001$ ). A comparação das médias de VCR dos fungos através do Teste de Tukey

demonstrou que os fungos E6, E17, E10, E21, E8, E9, E7, E20, e E12 apresentaram VCRs significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) que os demais fungos (Tabela 5), sendo utilizados para a continuidade dos experimentos de fermentação submersa.

Tabela 5 Velocidade de crescimento radial para os fungos isolados de efluente de laticínios, cultivados em Ágar Batata Dextrose adicionado de 5% de azeite de oliva

Fungo	VCR <sup>1,2</sup> (cm/d)
E6	1,7742±0,004 <sup>a</sup>
E17	1,6814±0,018 <sup>ab</sup>
E10	1,6628±0,032 <sup>ab</sup>
E21	1,5528±0,034 <sup>abc</sup>
E8	1,53±0,042 <sup>abc</sup>
E9	1,425±0,148 <sup>bcd</sup>
E7	1,3671±0,006 <sup>cd</sup>
E20	1,3442±0,038 <sup>cd</sup>
E12	1,16±0,000 <sup>d</sup>
E16	0,6839±0,002 <sup>e</sup>
E14	0,6528±0,054 <sup>e</sup>
E18	0,6392±0,222 <sup>ef</sup>
E1	0,4857±0,050 <sup>efg</sup>
E13	0,3857±0,024 <sup>efgh</sup>
E19	0,3946±0,012 <sup>fghi</sup>
E5	0,2971±0,000 <sup>ghij</sup>
E11	0,1660±0,088 <sup>hijl</sup>
E15	0,1042±0,026 <sup>ilm</sup>
E3	0,0798±0,015 <sup>lm</sup>

<sup>1</sup>Resultados de média ± desvio padrão

<sup>2</sup> Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

A Figura 11 apresenta as curvas de crescimento radial dos fungos com exceção do fungo E4, o qual não apresentou crescimento radial, sendo que na Figura 12 são mostrados os crescimentos radiais dos fungos selecionados para a fermentação submersa.

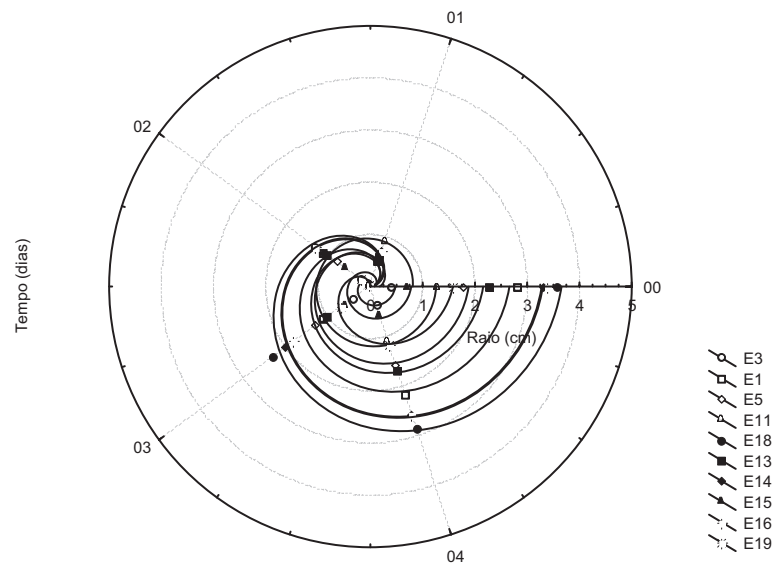


Figura 11: Crescimento radial dos fungos E3, E1, E5, E11, E18, E13, E14, E15, E16 e E19

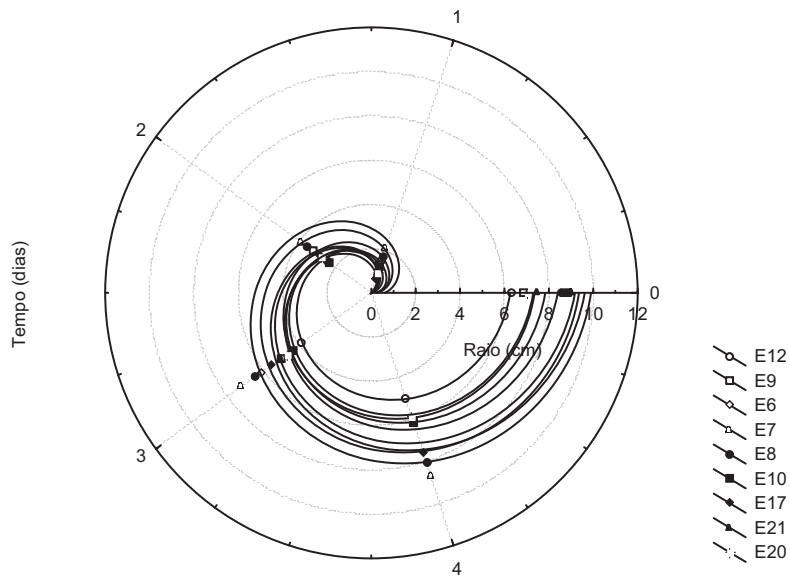


Figura 12: Crescimento radial dos fungos E12, E9, E6, E7, E8, E10, E17, E21 e E20

As elevadas velocidades de crescimento radial apresentadas pelos os fungos E6, E7, E8, E9, E10, E12, E17, E20 e E21 indicam a habilidade destes fungos de crescerem em meios contendo azeite de oliva como fonte de carbono.

Os fungos são considerados bons produtores de enzimas (Maia et al., 2001) e as lipases fúngicas são preferidas para a aplicação industrial, principalmente na indústria de alimentos (Mahadik et al., 2002). Sharma et al. (2001) cita inúmeras cepas de fungos como boas produtoras de lipases, entre elas *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Acremonium* e *Alternaria*. Segundo a literatura (Carvalho et al, 2005; Hasan et al, 2005; Mendes e Castro, 2003), os fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* são bons produtores de lipase.

Os fungos selecionados através da técnica de VCR por sua habilidade de crescimento em meio adicionado de azeite de oliva são pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, conforme Tabela 4.

Na literatura não foram encontrados relatos da produção de lipases por cepas de *Trichoderma*. Mas os fungos do gênero *Fusarium* têm se mostrado bons produtores, entre estes a cepa de *Fusarium solani*, como demonstrado por Maia et al. (2001).

A seleção de cepas selvagens hiperprodutoras ainda é uma técnica de grande importância, principalmente em países que apresentam uma grande biodiversidade como o Brasil. (Freire e Castilho, 2000 apud Vargas, 2004). O que justifica a busca de fontes alternativas de novas cepas fúngicas para a produção de lipase.

#### **4.4 Atividade lipolítica**

As Figuras 13a a 13i apresentam os gráficos da atividade lipolítica ( $\mu\text{molAG/mL}\cdot\text{min}$ ) no decorrer do tempo da fermentação submersa para os fungos e meios utilizados, cujo meio fora formulado com água residuária (item 3.4.3 de Material e Métodos). A Tabela 6 apresenta as máximas atividades lipolíticas obtidas, o tempo de fermentação e a produtividade máxima.

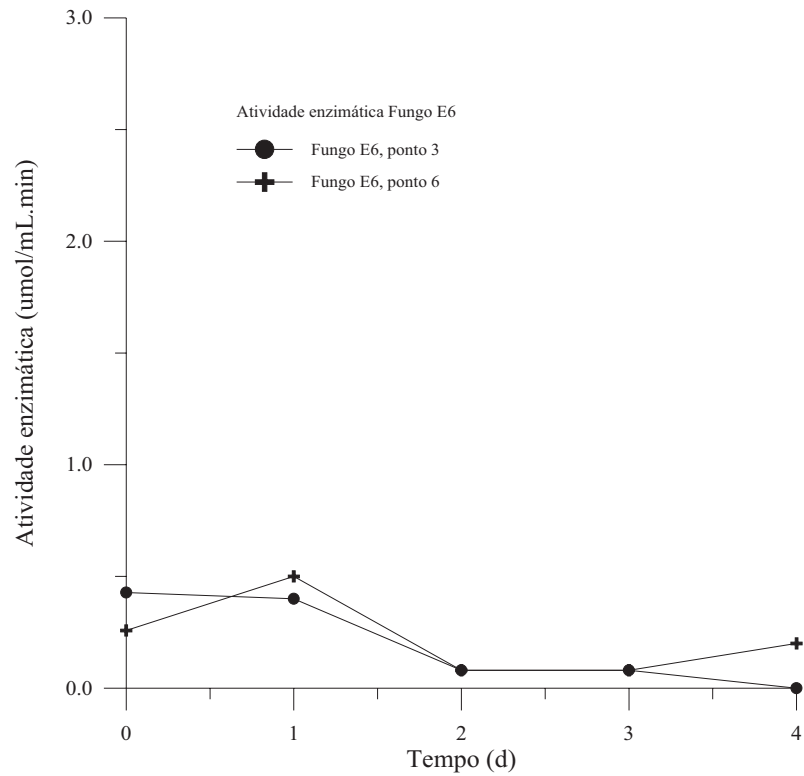


Figura 13a: Atividade lipolítica ( $\mu\text{molAG}/\text{mL}\cdot\text{min}$ ) versus tempo de fermentação do fungo E6. Ponto 3: saída do equalizador; Ponto 6: saída do tanque de aeração.

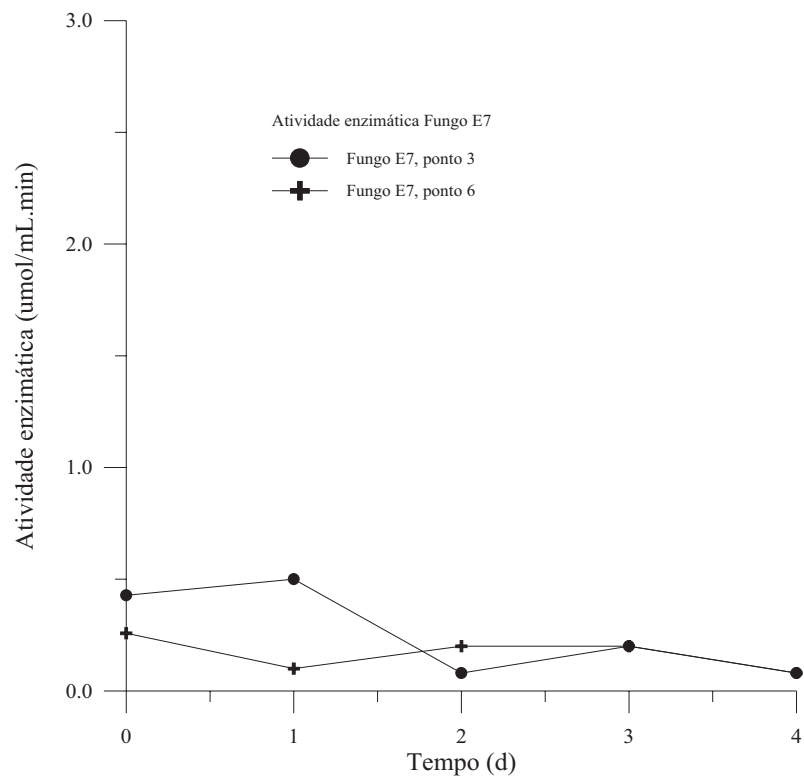


Figura 13b: Atividade lipolítica ( $\mu\text{molAG}/\text{mL}\cdot\text{min}$ ) versus tempo de fermentação do fungo E7. Ponto 3: saída do equalizador; Ponto 6: saída do tanque de aeração.

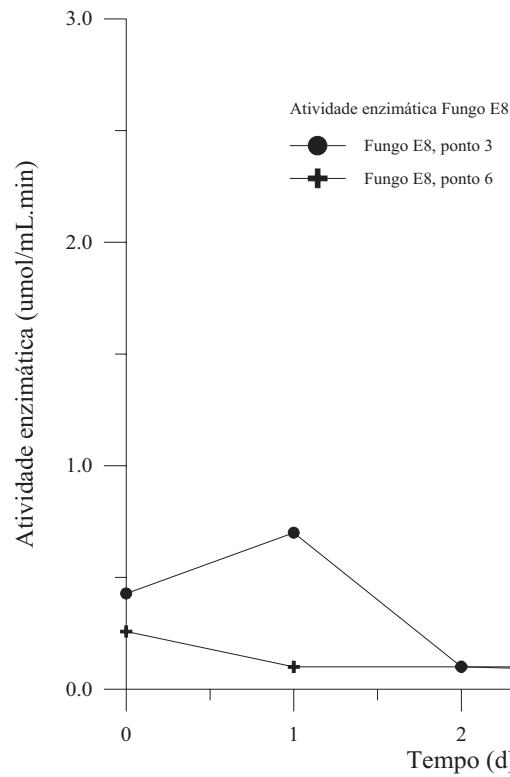


Figura 13c: Atividade lipolítica ( $\mu\text{molAG}/\text{mL}\cdot\text{min}$ ) versus tempo de fermentação do fungo E8. Ponto 3: saída do equalizador; Ponto 6: saída do tanque de aeração.

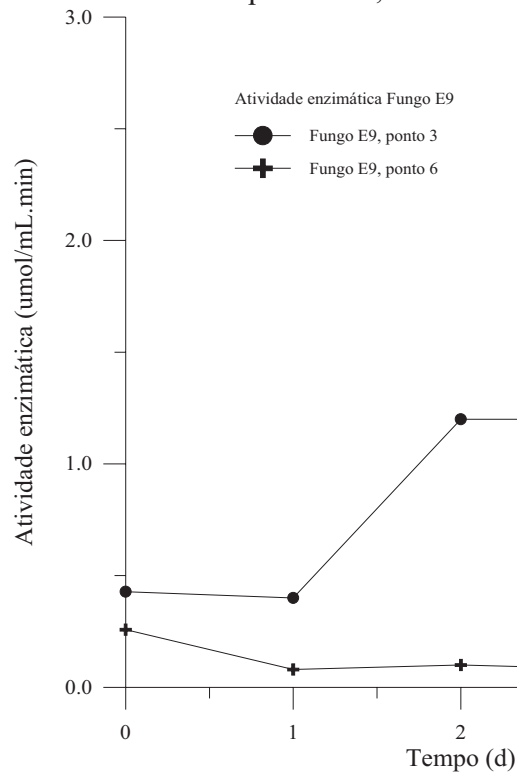


Figura 13d: Atividade lipolítica ( $\mu\text{molAG}/\text{mL}\cdot\text{min}$ ) versus tempo de fermentação do fungo E9. Ponto 3: saída do equalizador; Ponto 6: saída do tanque de aeração.

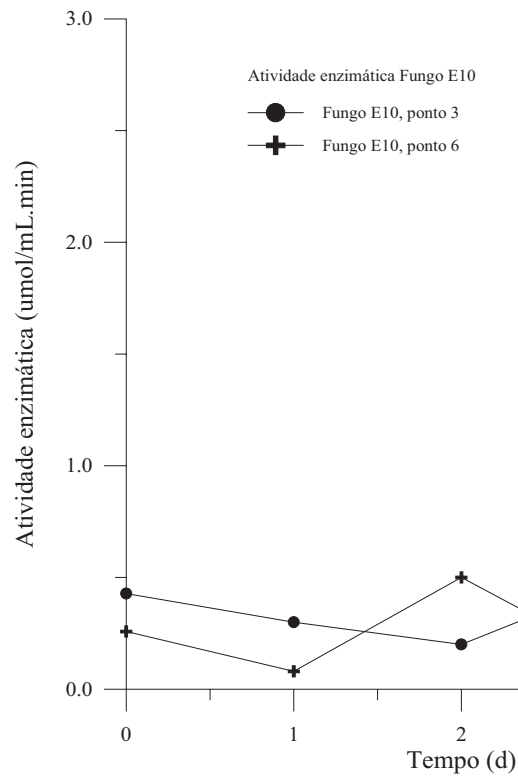


Figura 13e: Atividade lipolítica ( $\mu\text{molAG}/\text{mL}\cdot\text{min}$ ) versus tempo de fermentação do fungo E10. Ponto 3: saída do equalizador; Ponto 6: saída do tanque de aeração.

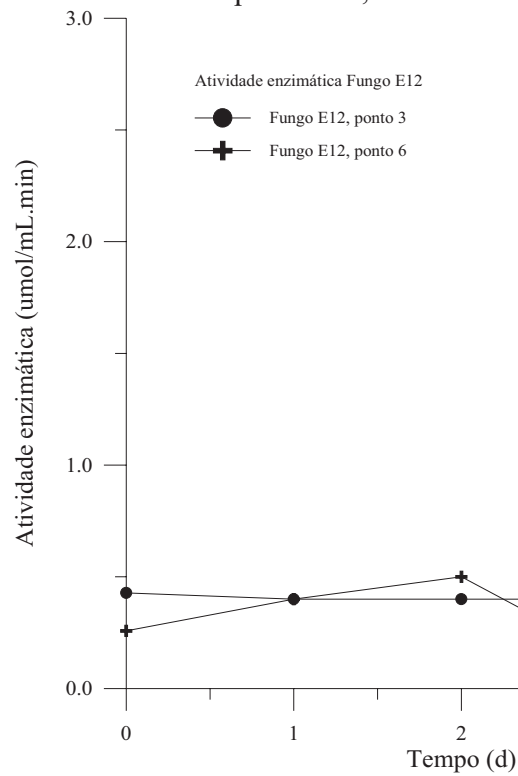


Figura 13f: Atividade lipolítica ( $\mu\text{molAG}/\text{mL}\cdot\text{min}$ ) versus tempo de fermentação do fungo E12. Ponto 3: saída do equalizador; Ponto 6: saída do tanque de aeração.

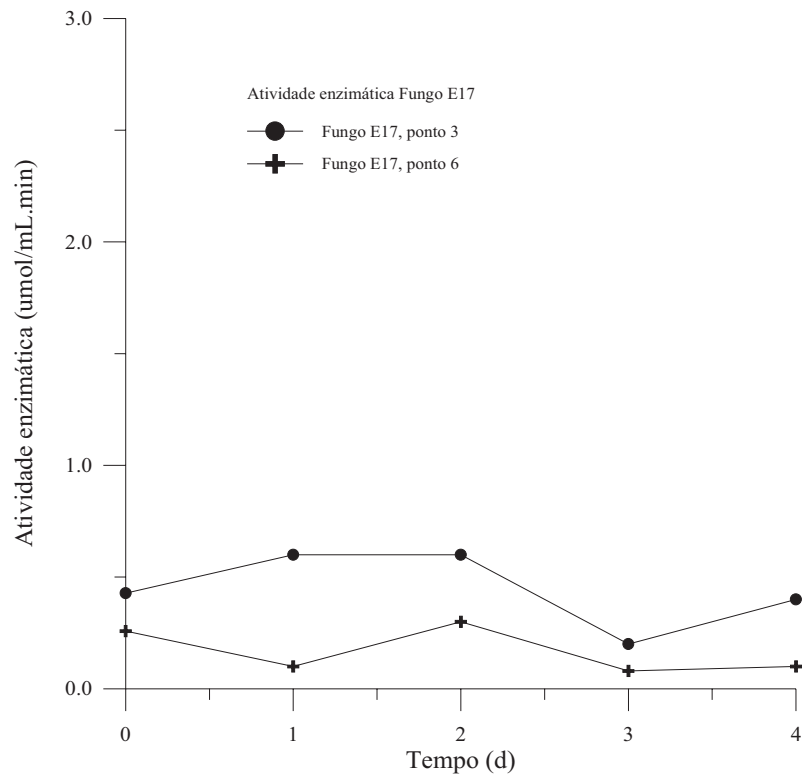


Figura 13g: Atividade lipolítica ( $\mu\text{molAG/mL}\cdot\text{min}$ ) versus tempo de fermentação do fungo E17. Ponto 3: saída do equalizador; Ponto 6: saída do tanque de aeração.

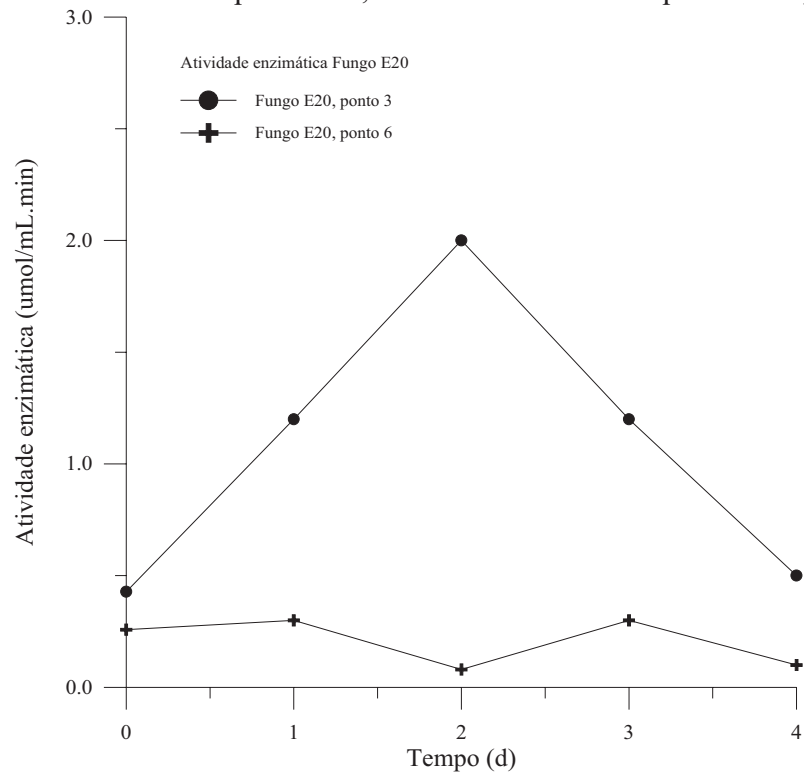


Figura 13h: Atividade lipolítica ( $\mu\text{molAG/mL}\cdot\text{min}$ ) versus tempo de fermentação do fungo E20. Ponto 3: saída do equalizador; Ponto 6: saída do tanque de aeração.



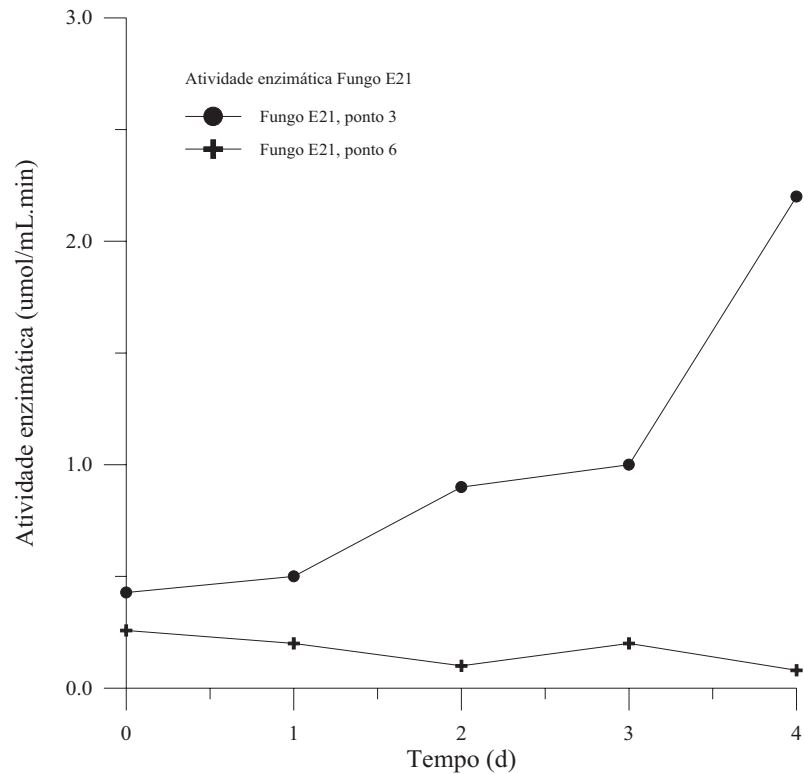


Figura 13i: Atividade lipolítica ( $\mu\text{molAG/mL}\cdot\text{min}$ ) versus tempo de fermentação do fungo E21. Ponto 3: saída do equalizador; Ponto 6: saída do tanque de aeração.

Tabela 6: Máximas atividades lipolíticas, tempo de fermentação e produtividade máxima obtidos durante a fermentação submersa.

Fungo	Ponto de coleta do efluente	Atividade lipolítica máxima ( $\mu\text{molAG/mL}\cdot\text{min}$ )	Tempo de fermentação (d)	Produtividade máxima*3 ( $\mu\text{molAG/mL}\cdot\text{min}\cdot\text{d}$ )
E6		0,496	1	0,068
E7		0,579	1	0,151
E8		0,744	1	0,316
E9		1,250	2	0,411
E10	Ponto 3*1	0,750	4	0,081
E12		-	-	-
E17		0,667	1	0,239
E20		2,042	2	0,807
E21		2,250	4	0,456
E6		0,597	1	0,321
E7		-	-	-

E8		-	-	-
E9		-	-	-
E10	Ponto 6* <sup>2</sup>	0,500	2	0,121
E12		0,417	1	0,159
E17		0,333	2	0,038
E20		0,333	1	0,075
E21		-	-	-

\*<sup>1</sup> AE inicial = 0,428( $\mu$ molAG/mL.min); \*<sup>2</sup> AE inicial = 0,258( $\mu$ molAG/mL.min); \*<sup>3</sup>  $P_{max} = AE_{max} - AE_{inicial} \div t$

Verifica-se nas Figuras 13a a 13i e na Tabela 6 que as maiores atividades lipolíticas foram obtidas utilizando-se o efluente coletado na saída do equalizador (P3) como meio de cultivo para a produção de lipases. O efluente coletado para realização do processo fermentativo apresentou concentração de DQO de 835,97 $\pm$ 17,26 mg/L; fósforo 0,26 $\pm$ 0,04 mg/L; NTK foi 10,55 $\pm$ 0,15 mg/L e óleos e graxas de 4,032 $\pm$ 0,344 mg/L. Já na saída do aerador obtiveram-se os seguintes resultados: DQO de 115,90 $\pm$ 61,37 mg/L; fósforo de 0,06 $\pm$ 0,01 mg/L; o NTK de 14,45 $\pm$ 0,05 mg/L e óleos e graxas de 4,084 $\pm$ 0,051 mg/L.

A concentração de DQO diminuiu da saída do equalizador (835,97 $\pm$ 17,26) mg/L para a saída do tanque de aeração (115,90 $\pm$ 61,37) mg/L, demonstrando que a quantidade de matéria orgânica presente no efluente foi reduzida durante o processo. O mesmo pode-se observar em relação à quantidade de fósforo presente na saída do equalizador (0,26 $\pm$ 0,04) mg/L e na saída do tanque de aeração (0,06 $\pm$ 0,01) mg/L demonstrando mais uma vez a eficiência do processo. Os valores de NTK obtidos na saída do equalizador (10,55 $\pm$ 0,15) mg/L foram inferiores àqueles obtidos na saída do aerador (14,45 $\pm$ 0,05) mg/L, diferença a um nível de significância de 0,0016. A diferença obtida entre os valores de NTK pode ser explicada pela solubilização de nitrogênio orgânico na forma de nitrito e nitrato no tanque de aeração ou ainda pelo fato das amostras terem sido coletadas simultaneamente, não levando-se em consideração o TDH (tempo de detenção hidráulica) do reator de lodo ativado. As concentrações de óleos e graxas obtidos nas saídas do equalizador e do aerador foram de (4,032 $\pm$ 0,344) mg/L e de (4,084 $\pm$ 0,051) mg/L, diferença a um nível de significância de 0,077.

As atividades lipolíticas máximas utilizando-se como meio de cultivo o efluente coletado na saída do equalizador (P3) foram obtidas a partir dos fungos E9, E20 e E21, de 1,250, 2,042 e 2,250  $\mu$ molAG/mL.min, respectivamente (Tabela 6). Entretanto, verifica-se que para os fungos E9 e E20, a atividade máxima foi obtida em 2 d de fermentação, enquanto que para o

fungo E21, a atividade máxima foi obtida no tempo de 4 d. Desta forma, a produtividade máxima em lipases, de 0,807 U/dia, foi obtida com o fungo E20, em 2 d de fermentação.

O fungo E20 foi classificado como do gênero *Penicillium*, enquanto que os fungos E9 e E21 foram pertencentes ao gênero *Aspergillus*, sendo ambos reportados como bons produtores de lipases por Carvalho et al, (2005); Hasan et al, (2005); Mendes e Castro, (2003).

O *Penicillium* foi identificado como bom produtor de lipases em fermentação submersa por D'Aniballe et al. (2005), que realizaram a seleção de microrganismos para a produção de lipases utilizando como meio de cultivo efluentes da produção de azeite de oliva suplementado com extrato de levedura 0,5 g/L<sup>-1</sup> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 1,0 g/L<sup>-1</sup> e pH ajustado em 6,1.

Segundo D'Aniballe et al. (2005), todos os fungos utilizados cresceram em efluente da produção de óleos e obtiveram atividades enzimáticas superiores que 0,30 UI mL<sup>-1</sup>. As atividades de lipolíticas mais elevadas foram obtidas com *C. cylindracea* NRRL Y-17506 e *G. candidum* Y-553 do C. (0,46 e 0,52 UI mL<sup>-1</sup>, respectivamente) após 168 h de fermentação. O *P. citrinum* NRRL 3754 e ISRIM 118 produziram níveis de atividade apreciáveis (0,34 e 0,38 UI mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Os autores definiram 1UI como a quantidade de enzima que produz 1 μmol produto/min nas condições do ensaio, tendo sido utilizado o método espectrofotométrico que usa β-naftilmiristato como substrato.

Os fungos E20 (*Penicillium*), E9 e E21 (*Aspergillus*) apresentaram atividade de 1,250 a 2,250 μmolAG/mL. As atividades enzimáticas obtidas não são comparáveis com as atividades enzimáticas obtidas por D'Aniballe et al. (2005), visto os métodos de determinação serem diferentes. Enquanto o autor utilizou o método espectrofotométrico, neste estudo a determinação de lipases foi realizada pelo método titulométrico.

Lin, Wang e Sung (2005) determinaram as melhores condições requeridas para a produção de lipases pelo *A. cinnamomea* em culturas submersas em frascos agitados. Uma vez que a composição do meio afeta a produção de lipases drasticamente, é importante compreender a influência de vários fatores para determinar as condições ótimas de cultivo. Além disso, o aumento da produtividade das lipases em culturas submersas pode ser de grande benefício para a redução dos gastos com a fabricação das enzimas em escala industrial. Estes autores obtiveram rendimento mais elevado em lipases pelo *A. cinnamomea*, de 26,69 mU/mL, em meio contendo glicerol. Empregaram também diferentes tipos de fontes de nitrogênio, em concentração de 0,5% (p/v), para a produção de lipases em culturas submersas de *A. cinnamomea*. As fontes estudadas foram amônia, sais de amônio, proteínas, peptídeos e aminoácidos. A produção máxima de lipase foi de 6,41 mU/mL para a cultura suplementada com L-aspargina, seguido, em ordem pela glicina (5,36 mU/mL), triptona (4,77 mU/mL) e L-

glutamina (4,74 mU/mL). Os mesmos autores estudaram os efeitos inibitórios e estimulatório de íons metálicos sobre a produção de lipases. No caso do *A. cinnamomea* observou-se uma maior produção de lipase quando os íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$  foram acrescentados ao meio. Em contraste, não detectou-se produção de lipases nos meios contendo  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ou  $\text{Li}^+$ . O efeito dos íons foi estudado em meio contendo nitrato de sódio 0,1%, fosfato de potássio monobásico 0,1%, sulfato de magnésio 0,05% e azeite de oliva como fonte de carbono na concentração de 1%. Para os autores uma unidade (1U) foi definida como a quantidade de enzima liberada por  $1\ \mu\text{mol}$  *p*-nitrophenol/min nas condições do ensaio.

Segundo Silva et al. (2005), a produção de lipase é influenciada pelo tipo e concentração de carbono e origem do nitrogênio, como também o pH e a temperatura.

De acordo com Ghosh et al., (1996) apud Lin, Wang e Sung (2005), determinados indutores como o glicerol possuem forte efeito na estimulação da produção de lipases. Os autores obtiveram um rendimento mais elevado em lipases pelo *A. cinnamomea*, de 26,69 mU/mL, em meio contendo glicerol. Apesar dos substratos lipídicos e dos ácidos graxos geralmente agirem como indutores para os fungos, em muitas espécies, tais como *Aspergillus* e *Rhizopus* as lipases características são produzidas. Enquanto, os autores não detectaram a produção de lipase pelo fungo *A. cinnamomea* em meio contendo lipídios ou ácidos graxos.

Mahadik et al.(2002) relataram que a atividade enzimática foi praticamente nula (0,02U/mL) quando a fermentação foi realizada sem a adição do óleo de oliva. Entretanto, valores superiores de atividade foram relatados para as lipases produzidas pelos fungos *Aspergillus niger* (7,6U/mL) e *Aspergillus oryzae* (9,5 U/mL), quando cultivados em meio de composição mais rica em fonte de carbono (2,0% p/v de glicose) e fonte de nitrogênio (extrato de levedura, 1,0% p/v e peptona 2,0% p/v), adicionado de óleo de oliva (2,0% p/v) após 48h de incubação a 30°C. Para os autores uma unidade de atividade foi expressa por  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrophenol liberado por min nas condições do ensaio.

Os valores da atividade enzimática na hidrólise do azeite de oliva tem sido amplamente utilizados para efeito de comparação e seleção de cepas produtoras de lipase. Estes valores podem variar significativamente dependendo do tipo de fermentação, da composição do meio de cultivo e também de outras variáveis do processo fermentativo, tais como pH, temperatura de incubação e presença de indutores da síntese de lipase como os óleos vegetais (CARVALHO et al., 2005).

Verifica-se que o azeite de oliva tem sido indicado como o indutor que apresenta os melhores resultados de indução da síntese de lipase por fungos, o que está de acordo com o utilizado neste trabalho. Entretanto, o custo da adição de azeite de oliva como indutor é

elevado se for considerada a produção de enzimas em larga escala. Desta forma, pode-se estudar a utilização de outros indutores, tais como o óleo de soja proveniente de frituras, o qual seria facilmente obtido, visto ser um resíduo de restaurantes.

Os autores Baron et al. (2005) estudaram a produção de lipases por *Penicillium corylophilum* IOC 4211 em dois meios de cultivo. O primeiro continha 0,2% KNO<sub>3</sub>; 0,1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,05% MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O; 0,043% ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,11% FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,015% MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O; 1,25% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,5% de extrato de levedura; 2% de peptona de carne e 1% de óleo de oliva. Já o segundo meio de cultivo continha 0,14% de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 0,073% MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,067% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01% ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,0007% FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,067% de glicose e 2% de óleo de oliva. As atividades enzimáticas obtidas com o segundo meio de cultivo foram superiores, de 7,1 U.mL<sup>-1</sup> após 6 dias de fermentação a 29°C e 120 rpm. Já com o primeiro meio de cultivo, o qual era mais simples, obteve-se atividade máxima de 3,25 U/mL após 3 dias de fermentação. Os meios de cultivo utilizados pelos autores são meios com maior quantidade de nutrientes que o meio de cultivo utilizado para a produção de lipases nesta pesquisa, onde utilizou-se o efluente de laticínios adicionado de nutrientes (nitrato de sódio, fosfato de potássio monobásico, sulfato de magnésio e azeite de oliva), o que justifica as menores atividades enzimáticas obtidas. O meio de cultivo utilizado neste trabalho consiste em um meio barato, visto ser sua base água residuária. Novas pesquisas podem ser realizadas a fim de otimizar a produção de lipases pelos fungos selecionados, estudando-se a adição de outros nutrientes ao efluente, temperaturas de produção, pH, concentração de oxigênio dissolvido, entre outros.

O uso de triglicerídeos como fonte de carbono é adequado para crescimento celular e produção de enzima, embora a indução da biossíntese da lipase em presença de ácidos graxos livres ou triglicerídeos seja controverso (Freire et al., 1997b apud Vargas 2004). A presença de materiais que apresentam lipídios no meio de cultura usualmente aumenta em muito os níveis de atividade lipásica (Dominguez et al., 2003 apud Vargas 2004).

Vários trabalhos têm reportado o uso de resíduos provenientes da agroindústria na produção de lipase por fermentação em estado sólido, que estão sendo utilizados como fonte de nutrientes para o crescimento microbiano. Resíduos como os da indústria de óleos vegetais (óleo de oliva, óleo de soja, óleo de babaçu, óleo de gergelim, óleo de semente de girassol, óleo de coco) (Cordova et al., 1998; Kamini et al., 1998; Gombert et al., 1999; Palma et al., 2000; Capra et al., 2003; Leal et al., 2003 apud Vargas, 2004) e subprodutos como farelo de casca de trigo (Bertolin et al., 2001; Benjamin e Pandey, 2001; Mahadik et al., 2002; Ul-Haq et al., 2002; Meira et al., 2003 apud Vargas 2004), farelo de cevada (Dominguez et al., 2003

apud Vargas 2004), farelo de arroz (Rao et al., 1993 apud Vargas 2004) dentre outros, vem sendo utilizados (Vargas 2004).

Os efeitos causados pela adição de nutrientes, e a presença de indutores durante o processo de produção da lipase em estado sólido ou submerso foram estudados por Freire et al., 1997b; Maia et al., 1999; Gombert et al., 1999; Corzo e Revah, 1999; Pastore, 2000; Palma et al., 2000; Maia et al., 2001; Elibol e Ozer, 2002; Dominguez et al., 2003 apud Vargas 2004. Em alguns casos, o uso de suplementações tem possibilitado aumentos razoáveis na capacidade produtiva dos microrganismos. (Kamini et al., 1998 apud Vargas 2004).

O melhor meio de cultivo para a de produção de lipases foi o efluente da saída do equalizador (P3), o que pode ser justificado pelas maiores quantidades de matéria orgânica, fósforo e nitrogênio encontradas neste efluente, em comparação com o efluente coletado na saída do aerador. Mahadik et al.(2002) utilizaram meios de cultivo ricos em fontes de carbono e de nitrogênio para a produção de lipases. O nitrogênio é um nutriente essencial para a formação estrutural dos fungos, bem como para a produção de enzimas, visto estas serem constituídas de aminoácidos, os quais apresentam nitrogênio na sua estrutura. Baron et al. (2005) utilizaram extrato de levedura e peptona de carne como fontes de nitrogênio e glicose como fonte de carbono, além de outros nutrientes necessários, observando-se assim ser necessária a utilização destas fontes para uma produção lipásica mais elevada.

As lipases podem ser utilizadas para o tratamento de efluentes. O uso do próprio efluente na produção de lipases constitui um processo de baixo custo, sendo uma alternativa para as indústrias, visto as lipases comerciais possuírem um preço muito elevado.

A produção de lipases utilizando o efluente é viável, uma vez que esta apresenta elevada carga de nutrientes ainda disponíveis para o crescimento fúngico e produção de enzimas. A presença de lipídios no efluente possibilita a produção das lipases, uma vez que estes são utilizados como fonte de carbono para o crescimento fúngico. Além disso, o meio de cultivo é de baixo custo e as lipases produzidas podem ser utilizadas posteriormente no tratamento de efluentes.

## 5 CONCLUSÃO

A caracterização do efluente de laticínios mostrou que os parâmetros DBO, DQO, fósforo, nitrogênio e óleos e graxas neste efluente variam dependendo da produção diária do laticínio;

Foram isolados 21 fungos, pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Trichoderma*;

Foram selecionados os fungos E6, E7, E8, E9, E10, E12, E17, E20 e E21 devido à capacidade de crescimento em meio contendo azeite de oliva;

Na fermentação submersa os fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* (E9 e E21) e *Penicillium* (E20) apresentaram as maiores atividades enzimáticas de 1,250, 2,042 e 2,250  $\mu\text{molAG/mL}\cdot\text{min}$ ;

A maior produção de lipases ocorreu com a utilização do efluente da saída do equalizador.

## REFERÊNCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19. ed. Washington. 1995.
- AMORIM, R.V.S.; SOUZA, W.; FUKUSHIMA, K.; TAKAKI, G.M.C. Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture, **Brazilian Journal of Microbiology**. v.32, n 1, São Paulo: jan/mar. 2001
- ARMAS, J.C.; MENDOZA, J.C.D.; JÚSTIZ, O.H. Lipase expression by *Mucor griseocyanus* cultures on different substrates, **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Recife, 2005.
- BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. **Microbiologia Básica**. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1998.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. *Yeasts characteristics and identification*. 3°ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1990.
- BARON, A. M. et al.. Produção e caracterização de lipases de *Penicillium corylophilum* IOC 4211, **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Recife, 2005.
- BAILEY, James E.; OLLIS, David F.. Biochemical engineering fundamentals. 2.ed. Boston: McGraw Hill, 1986. 984 p.
- BERNARDES, R. S.; SOARES, S. A. *Esgotos combinados e controle da poluição: estratégias para planejamento do tratamento da mistura de esgotos sanitários e águas pluviais*. Brasília: Caixa, Agosto 2004.
- BORNSCHEUER, et al.. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **Review: Trends in biotechnology**, v. 20, n. 10, 433 – 437, Out. 2002.
- BORZANI, W. et al.. Biotecnologia industrial: Fundamentos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 1 v.
- BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E. W. A. Manual de tratamento de águas residuárias industriais. São Paulo, Editora CETESB, 1993, 764 p.
- CARVALHO, P. de O. et al.. Reações catalisadas por lipases para concentração de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**. v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.
- CARVALHO, P.O.; et al. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química nova**, vol. 28, nº4, 614 – 621p, 2005



CASTRO, H.F., MENDES, A.A., SANTOS, J.C., AGUIAR, C.L... Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química nova**, v. 27, n. 1, p. 146 – 156, 2004.

CHARBENEAU, R. BENDIET, P. LOEHR, R. Groundwater remediation. Lancaster: Technomic, 1992. 187 p.

CRUEGER, W & CRUEGER, A. **Biotechnologia – Manual de Microbiologia Industrial**. Editorial Acribia, Zaragoza, Espanha, 1993.

DAMASO, M.C.T.; COURI, S.; PASSIANOTO, M.A.; FREITAS, S.C. Produção de lipases por fermentação semi-sólida tendo como indutores da síntese, subprodutos do refino do óleo de milho. **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Recife, 2005.

D'ANNIBALE, A; SERMANNI, G. G.; PETRUCCIOLI, M.; FEDERICI, F. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology**, 2005.

FALONY, G.; MENDONZA, J.C.D.; ARMAS, J.C. Obtention of *A. niger* lipases by solid state fermentation. **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Recife, 2005.

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

FERNANDES, M.L.; MEIRA, J.A.; MITCHELL, D.A. KRIEGER, N. Produção da lipase de *Bacillus megaterium* por FES para aplicação em biocatálise. **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Recife, 2005.

FREIRE, D.M.; TELES, E.M.F.; BON, E.P.S.; LIPPEL SAN'T ANNA, G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter: Effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 63-65, p. 409-421, Sept, 1997(a) .

GANDHI, N. Applications of Lipase. **Jornal American Oil Chemistry Society**, v. 74, n 6, p. 621 – 634, 1997.

GESSESSE, A., et al.. Lipase and protease extraction from activated sludge. **Water Research**, v. 37, n° 15, p. 3652 – 3657, Set, 2003.

GOMBERT, A.K., et al.. Lipase, amylase and protease production by *Penicillium restrictum* a solid stat fermentation using babassu oil cake. **Process Biochem.** v. 35, p. 85-90, 1999.

GUPTA, R. GUPTA, N, RATHI, P. Bacterial lipases: na overview of production, purification na biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763 – 781, jun. 2004.

GUTARRA, M.L.E.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Seleção de fungos produtores de lipase por fermentação em estado sólido. **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Recife, 2005.

HASAN, F.; SHAH, A.A; HAMMED. A. Industrial application of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology** 39, 235 – 251, 2006.

IMHOFF, Klaus R.. Manual de tratamento de águas residuárias. São Paulo: Edgard Blücher, 2002. 301 p. ISBN 852120132X

JORDÃO, E.P.; PESSOA, C.A. Tratamento de esgotos domésticos. Rio de Janeiro: ABES, 1995.

JUNG, F.B., CAMMAROTA, M.C., FREIRE, D.M.G. *Tratamento de efluente com elevado teor de gordura: enzimas / lodos ativados*. CD-Rom, **XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ**, Natal, RN, 2002.

KAUSHIK, R; et al.. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 40, 121 – 126, 2006.

KELLY, A.L., FOX, P.F.. *Indigenous enzymes in milk: A synopsis of future research requirements*. International Dairy Journal 16, 707 – 715, 2006.

KREUZER, H.; MASSEY, A. Trad. Ana Beatriz Gorini da Veiga... [et al.]. *Engenharia Genética e biotecnologia*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

LEAL, M.C.M.R. Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios. Rio de Janeiro: 2000. Dissertação de Mestrado, PEQ/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2000.

LEHNINGER, Albert Lester. **Bioquímica**. Tradução da 2. ed. americana, supervisão: José Reinaldo Magalhães. São Paulo: Edgard Blücher, 1976.

LEHNINGER, Albert Lester. **Princípios de Bioquímica**. Traduzido por Arnaldo Antônio Simões, Wilson Roberto Navega Lodi. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LEHNINGER, A.L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. Tradução da 2. ed, São Paulo: Sarvier, 2000.

LIMA, U. A.; et al.. **Biotecnologia Industrial**. V. 3. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001.

LIMA, V. M. G. M.; KRIEGER, D.A.; FONTANA, N.; DOMINGOS, J.. Produção e purificação da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 e sua aplicação em biocatálise em solventes orgânicos. 2004 Tese doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

LIN, E.S.; WANG, C.C.; SUNG, S.C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n°.1, 98-102, 2005.

MAHADIK, N.D.; et al.. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.

MAIA, M.M.D.; et al.. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 23-27, 2001.

MALAJOVICH, M.A. **Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Axcel Books, 2004. 344 p.

MALDONADO, R.R.; BURKERT, J.F.M.; RODRIGUES, M.I. Produção de Lipase por *Penicillium restrictum*, **IX Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP**, Setembro, Campinas, SP, 2001.

MALDONADO, R.R.. **Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais**. Campinas, 2006. 131 p Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2006.

MENDES, A.A; CASTRO, H.F.. Aplicação de lípases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química nova**, v. 28, n. 2, p. 296 – 305, 2005.

MENDES, A.A; CASTRO, H.F..Effect on the enzymatic hydrolysis of lipids from dairy wastewater by replacing Gum Arabic emulifier for sodium chloride. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 48, p. 135-142, 2005.

METCALF E EDDY. Wastewater engineering – Treatment, disposal and reuse, 3. ed. , McGraw-Hill.- International Edition, 1991.

MIERZWA, J. C.; HESPANHOL, I. *Água na indústria: uso racional e reuso*. São Paulo: Oficina de Textos, 2005.

MIRANDA, O. A.; et al.. Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. **Bioresource Technology**, v.69, p.145-147, 1999.

MONTESINO, A. I. L.; et al.. Estudio de la degradación enzimática de residuales líquidos ricos en grasa y aceites. **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Recife, 2005.

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

PARK, K. Y. *Produção de enzimas*. In \_\_\_\_\_ Tecnologia das Fermentações. São Paulo, Edgard Blucher, 1975.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2. ed. São Paulo: MAKRON BOOKS, 1996.

POESTER, José Luiz; LEITÃO, Magda R. Apostila de tratamento de efluentes agroindustriais. v.1. Porto Alegre: Senai/RS, 1989.

POZZA, E.L.; MALDONADO, R.R.; MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M.I. Estudo da etapa de upstream e purificação da lipase de *Geotrichum candidum* produzida com meios industriais. **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Recife, 2005.

REGULY, J. C. **Biotechnologia dos processos fermentativos: fundamentos, matérias-primas agrícolas, produtos e processos**. Pelotas: Universitária/UFPel, 1996. 1 v.

REGULY, J.C. **Biotechnologia dos processos fermentativos: fundamentos, matérias-primas agrícolas, produtos e processos**. Pelotas: Universitária, 1996. 3 v.

RIBEIRO, M. C., SOARES, M.M. *Microbiologia Prática*. Roteiro e Manual, Bactérias e Fungos. 1. ed. Rio de Janeiro: Atheneu , 2000. 112 p.

RODRIGUES, K.A. Tratamento biológico de água residuária sintética de laticínios por decomposição fúngica. 1999. Fortaleza, Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil, área de concentração em Saneamento Ambiental, Universidade Federal do Ceará), 113p. 1999.

RODRIGUEZ, D.T. El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos, *Ecosistemas Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*. Ano XII, nº2, Mayo – Agosto 2003. Disponível em: (URL: [http://www.aeet.org.ecosistemas/032/informe\\_1.htm](http://www.aeet.org.ecosistemas/032/informe_1.htm)) Acesso em: 22 dez. 2005

ROSA, A.P. Processos de biorremediação na mitigação do impacto ambiental, devido a eventuais derrames de óleo na bacia de Campos – Experimentos laboratoriais. 2001 Dissertação de Mestrado, LENEP/CCT/UENF, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2001. Disponível em: <<http://web.capes.gov.br/AgDw/silverstream/pages/frPesquisaTeses.html>> Acesso em 16 ago. 2005.

SÁ, I.M.B. Biotratamento de águas residuárias de uma indústria de laticínios por ação de fungos decompositores. 1997. Fortaleza. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, 83p. 1997.

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

SCHMIDELL, W.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A. **Biociencia Industrial**. V. 2. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001.

SILVA, W. O. B.; MITIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, H.. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 321-326, 2005.

SOARES, C. M. F. *Otim. por plan. Exp. da imobilização de lipase em sílica de poros. controlada na presença de estabilizantes*. 2000. Dissertação de Mestrado, FEQ/UNICAMP, Campinas-SP, 2000.

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

TEIXEIRA, G.A. *Tratamento seqüencial de efluentes da indústria de laticínios: Hidrólise de gorduras e tratamento biológico*. 2001. Dissertação de Mestrado, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro - Engenharia Química, Rio de Janeiro, 2001.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2000.

Trevan, M.D. et al. (Ed.). **Biociencia**: principios biológicos. Zaragoza: Acribia, 1990.

TUNDISI, J. G. *Água no Século XXI: Enfrentando a Escassez*. São Paulo: RiMa, IIE, 2003. 248 p

UL-HAQ, I., IDREES, S., RAJOKA, I.. Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 637 – 641, 2002.

VARGAS, G.D.L.P., 2004. Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. URI, Campus de Erechim/ RS.

VAZOLLER, Rosana Filomena et al. **Microbiologia de lodos ativados**. São Paulo: CETESB, 1989. (Série Manuais/Secretaria do meio Ambiente do Estado de São Paulo).

VEIGA, A.A. Biodegradação de gordura em efluente, através da adição controlada de enzimas e microorganismos em reatores aeróbios em série. Profissionalizante. FEN/ UERJ Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Engenharia Ambiental, Rio de Janeiro, Brasil, 2003. Disponível em:

<<http://web.capes.gov.br/AgDw/silverstream/pages/frPesquisaTeses.html>> Acesso em 16 ago. 2005.

Von SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 2. ed. Belo Horizonte: Ed. Universidade Federal de Minas Gerais, 1996. 243 p. ISBN 8570411146

YOKOYA, F. Fermentação cítrica. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia 'Andr, 1992. 82 p.