

APLICAÇÕES E PRODUÇÃO DE LIPASES MICROBIANAS

APPLICATIONS AND PRODUCTION OF MICROBIAL LIPASES

Luciane Maria Colla^{*1}, Christian Oliveira Reinehr², Jorge Alberto Vieira Costa³

¹Dra. em Engenharia e Ciência de Alimentos, Professora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia, Universidade de Passo Fundo. E-mail: lmcolla@upf.br

²Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, Professor dos Cursos de Engenharia de Alimentos e Engenharia Ambiental, Universidade de Passo Fundo. E-mail: reinehr@upf.br

³Engenheiro de Alimentos. Professor do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS. E-mail: jorgealbertovc@terra.com.br

*Autor para correspondência: Campus I, Prédio L1, Universidade de Passo Fundo - BR 285, Bairro São José - Passo Fundo/RS, CEP: 99052-900 - Cx. Postal 611 - Fone: (54) 3316-8193

RESUMO

As lipases são enzimas utilizadas em diversos setores industriais como o alimentício, farmacêutico e na indústria química. Estas enzimas catalisam reações de hidrólise, esterificação, interesterificação e transesterificação. A produção de enzimas por microrganismos através de métodos biotecnológicos pode ser realizada através de bioprocessos submersos e em estado sólido, podendo ser afetada por fatores como o pH, a temperatura, a composição do meio, o preparo do inóculo, a aeração, a agitação, as fontes de carbono e nitrogênio, a concentração de oxigênio dissolvido, a cepa do microrganismo, entre outros. Objetivou-se revisar as principais aplicações das lipases, bem como os microrganismos produtores e os fatores que afetam a produção de lipases.

Palavras-chave: lipases, microrganismos, produção.

ABSTRACT

Lipases are enzymes used in various industrial sectors such as the food, pharmaceutical and chemical synthesis industries. These enzymes catalyze reactions of hydrolysis, esterification, interesterification and transesterification. The production of enzymes by microorganisms through biotechnology can be accomplished by submerged and solid state fermentations. The production of microbial lipases can be affected by numerous factors such as pH, temperature, medium composition, inoculum preparation, aeration, agitation, sources of carbon, nitrogen, oxygen concentration, microorganism, among others. The aim of this work was to review the main applications of lipases, as well as producing microorganisms and factors that influence the production.

Key-words: lipases, microorganisms, production.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são utilizadas atualmente para uma variedade de aplicações industriais (Haak et al., 2006). O mercado industrial de enzimas continua crescendo devido à implantação de novas tecnologias de produção, ao uso da engenharia genética na produção e ao surgimento de novos campos de aplicação. O mercado global de enzimas em 2007 foi de 2,3 bilhões de dólares e espera-se

que seja de 2,7 bilhões em 2012 (Iyer; Ananthanarayan, 2008).

Dentre estas enzimas, as lipases (triacilglicerol-acil-hidrolases E.C.3.1.1.3) são muito utilizadas, em virtude da grande gama de reações que podem catalisar, como a hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis (TAG) fornecendo diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG), glicerol e ácidos graxos livres (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001), além de reações de esterificação, transesterificação e interesterificação de lipídios. Por este motivo, são aplicáveis em uma diversidade de setores industriais, em especial, na indústria química, na produção de surfactantes (Yu et al., 2008; Watanabe et al., 2001), na formulação de detergentes (Saisubramanian et al., 2006), na resolução de misturas racêmicas (Rao et al., 1996), no tratamento de resíduos ricos em óleos e gorduras (Leal et al., 2002) e na área da saúde, compondo medicamentos, em diagnósticos, cosméticos ou antibióticos (Hasan; Shah; Hameed, 2006). Na indústria de alimentos apresentam aplicações na síntese de emulsificantes (Kim; Youn; Shin, 2006), como os mono e diacilgliceróis (Kittikun; Kaewthong; Cheirsilp, 2008); na transformação de lipídios, a fim de se produzir lipídios estruturados com elevados teores de ácidos graxos polinsaturados (Reshma et al., 2008; Wang; Xu; Shan, 2008); na produção de margarinas; no desenvolvimento de aromas (Salah; Ghamghui; Miled, 2007); na maturação de queijos (Dupuis; Corre; Boyaval, 1993) e embutidos cárneos, entre outros. Recentemente, têm sido utilizadas na indústria da bioenergia, para a produção de biodiesel (Park; Sato; Kojima, 2006).

As lipases podem ser de origem vegetal, animal ou microbiana, sendo as últimas as mais utilizadas. Dentre as enzimas microbianas, as produzidas por fungos são especialmente valorizadas por serem extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de cultivo (Carvalho et al., 2003). Os fungos filamentosos têm sido estudados como bons produtores de lipases, sendo os gêneros mais citados *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Fusarium* (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001; Maia et al., 2001; Mahadik et al., 2002; Haq; Idrees; Rajoka, 2002).

As enzimas industriais são produzidas principalmente através de bioprocessos submerso em cultivos em batelada e batelada alimentada (Haack et al., 2006) usando fungos filamentosos, sendo os gêneros mais citados para a produção de lipases os *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Fusarium* (Haq; Idrees; Rajoka, 2002; D'Aniballe et al., 2006). Sabe-se, entretanto, que a produção de enzimas pode ser incrementada através de processos em estado sólido, através do uso de fungos filamentosos (Pandey; Soccol, 2000; Pandey, 2003).

Os fatores que podem afetar a produtividade destes bioprocessos são principalmente os tipos e concentrações de nutrientes, o pH, a agitação e a presença e concentração de indutores. A realização de pesquisas que utilizem microrganismos isolados de novos ambientes, bem como a utilização de resíduos agroindustriais na composição dos meios é necessária, a fim de obterem-se elevadas produtividades a custos menores.

Objetiva-se revisar as principais aplicações das lipases, bem como microrganismos produtores e fatores que influenciam na produção de lipases por microrganismos.

2. LIPASES: DEFINIÇÕES E APLICAÇÕES

As lipases são hidrolases que atuam em ligações éster do grupo carboxílico, tais como reações de esterificação, interesterificação e transesterificação em meios não aquosos, acilação de mentóis e glicóis e síntese de peptídios (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001; Carvalho et al., 2003).

A função fisiológica das lipases é a hidrólise dos triglicerídios em diglicerídios, monoglicerídios e ácidos graxos livres e glicerol. Em eucarióticos, as lipases estão envolvidas em

vários estágios do metabolismo de lipídios, incluindo a digestão, absorção, reconstituição de gorduras e o metabolismo de lipoproteínas. Em plantas, as lipases são encontradas em tecidos de reserva de energia (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001).

As lipases podem ser aplicadas na indústria de detergentes (Hasan; Shah; Hameed, 2006), no tratamento de efluentes (Mendes; Castro, 2005; Rosa; Cammarota; Freire, 2006; Castro; Mendes; Santos, 2004), para o desenvolvimento de cosméticos, compondo medicamentos (enzimas digestivas) ou como reagentes clínicos (Elibol; Ozer, 2002) e na resolução de misturas racêmicas (Rao; Jayaraman; Lak, 1993). Na indústria de alimentos apresentam aplicações na síntese de emulsificantes (Kim; Youn; Shin, 2006), no aumento dos teores de ácidos graxos insaturados em lipídios (Carvalho et al., 2006), na produção de margarinas, no desenvolvimento de aromas (Larios et al., 20004), na maturação de queijos (Dupuis; Corre; Boyaval, 1993), entre outros. O Quadro 1 apresenta uma série de aplicações industriais de lipases.

Quadro 1 Aplicações industriais de lipases

INDÚSTRIA	AÇÃO	PRODUTO OU APLICAÇÃO
Detergentes	Hidrólise de gorduras	Remoção de óleos
Derivados de laticínios	Hidrólise da gordura do leite, maturação de queijos, modificações de manteigas	Desenvolvimento de agentes flavorizantes em leite, queijos e manteiga
Panificação	Melhorador de flavors	Prolongar a vida de prateleira
Bebidas	Aromas	Bebidas
Carnes e peixes	Desenvolvimento de flavors	Remoção de gordura, produtos de carnes e peixes
“Health foods”	Transesterificação	Produção de alimentos com apelo nutricional
Gorduras e óleos	Transesterificação, hidrólise	Manteiga de cacau, margarinas, ácidos graxos, glicerol, mono e diglicerídios
Química	Enantiosseletividade, síntese	Construção de blocos quirais
Farmacêutica	Transesterificação, hidrólise	Lipídios específicos, digestivos
Cosméticos	Síntese	Emulsificantes, umidificantes
Papel	Hidrólise	Melhoria da qualidade de papel
Limpeza	Hidrólise	Remoção de gorduras
Couro	Hidrólise	Produtos de couro

Fonte: Adaptado de Sharma; Chisti; Banerjee (2001)

2.1 Indústria de Alimentos

A modificação de óleos e gorduras é uma das áreas de grande crescimento na indústria de alimentos, demandando novas tecnologias. Óleos vegetais modificados estruturalmente de forma a

apresentarem triacilgliceróis estruturados de importância nutricional e propriedades físico-químicas alteradas apresentam um grande potencial de mercado. Óleos baratos podem ser transformados em produtos de maior valor agregado tais como triacilgliceróis de baixa caloria e óleos enriquecidos em ácido oléico (Hasan; Shah; Hameed, 2006).

As lipases são utilizadas no processamento do ácido gama linolênico, astaxantina (corante alimentício), metilcetonas (moléculas características de flavor em queijos azuis), modificação de óleos vegetais na posição 2 do triacilglicerol, a fim de obter gorduras similares à gordura do leite humano para alimentação infantil, e para a produção de monoacilgliceróis para uso como emulsificante nas indústrias alimentícia e farmacêutica (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001).

A interesterificação e a hidrogenação são técnicas que têm sido utilizadas para a preparação de glicerídios para fabricação de manteigas e margarinas. A reação de interesterificação convencional é conduzida na presença de catalisadores como o sódio, não sendo seletiva com respeito à esterificação dos ácidos graxos em uma posição respectiva no glicerol. A reação conduzida com lipases como catalisadores é muito mais específica, no entanto requer meio aquoso, o que diminui o rendimento da reação (Hasan; Shah; Hameed, 2006).

As lipases têm sido utilizadas para a síntese de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta e álcoois, os quais são compostos voláteis responsáveis por características de odor em alimentos (Hasan; Shah; Hameed, 2006). Por exemplo, a produção de butil acetato, o qual possui aroma de abacaxi, pode ser realizada pela reação de esterificação entre butanol e ácido acético catalisada por lipases extraídas de *Rhizopus oryzae* (Salah; Ghamghui; Miled, 2007). Similarmente, Habulin et al. (2007) citam a utilização de lipases na produção de ésteres de terpenos, os quais são utilizados como aromatizantes frutais em bebidas e alimentos.

A produção de aromas em produtos lácteos é acelerada quando há a formação de ácidos graxos livres e peptídios solúveis e aminoácidos durante a maturação do produto. As lipases têm sido utilizadas para a produção destes aromas. A hidrólise da gordura do leite promovida pelas lipases ocasiona a produção de compostos característicos de aromas em queijos, acelerando a maturação destes e possibilitando a produção de produtos similares a queijos e a lipólise da manteiga e do creme de leite. Os ácidos graxos livres gerados pela ação das lipases sobre a gordura do leite permitem o desenvolvimento de inúmeros novos produtos como os queijos leves, que apresentam características próprias de aroma, geradas pela produção de ácidos graxos de cadeia curta, os quais podem ser metabolizados por microrganismos e transformados em compostos como álcoois, cetonas, ésteres e lactonas (Hasan; Shah; Hameed, 2006).

2.2 Detergentes

Um dos campos de maior aplicação industrial das lipases é a indústria de detergentes. O poder de limpeza dos detergentes é aumentado pela adição de enzimas em sua composição, como amilases, proteases, celulasas e lipases (Hasan; Shah; Hameed, 2006). Para uso em detergentes, as lipases precisam ser termoestáveis e permanecerem ativas em meios alcalinos, uma vez que precisam atuar em condições de lavagem (pH's 10 a 11 e 30 a 60°C). Além disso, devem apresentar uma baixa especificidade pelo substrato, habilidade para hidrolisar gorduras de várias composições e estabilidade a compostos das fórmulas dos detergentes, como benzeno sulfonatos e proteases (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001).

A produção de detergentes corresponde a 32% da venda total de lipases. Estima-se que 1000 t de lipases são adicionadas a aproximadamente 13 bilhões de toneladas de detergentes produzidos anualmente (Jaeger; Reetz, 1998).

2.3 Tratamento de Efluentes

A utilização de enzimas no tratamento de despejos industriais foi proposta em 1930. Entretanto, só recentemente seu desenvolvimento como alternativa ao tratamento convencional de efluentes tem despertado grande interesse de pesquisa, em função das vantagens apresentadas, entre as quais podem ser citadas: o aumento da taxa de introdução no ambiente de poluentes orgânicos estranhos aos microrganismos e recalcitrantes, o que diminui as possibilidades de se realizar um tratamento convencional biológico ou químico que seja eficiente; há um crescente reconhecimento da capacidade das enzimas para atuar sobre poluentes específicos no tratamento; avanços recentes na biotecnologia permitiram a produção de algumas enzimas técnicas e economicamente viáveis, devido ao desenvolvimento dos procedimentos de isolamento e de purificação de microrganismos (Mendes; Castro, 2005).

Os efluentes industriais gerados em frigoríficos, abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral possuem 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 à recuperação ou diminuição da carga de gorduras de efluentes são de interesse para a indústria. Um tratamento preliminar desses efluentes por meio da ação das lipases reduz o teor de lipídios, o diâmetro das partículas de gorduras em até 60% e o tempo de residência do efluente nas lagoas de estabilização (Castro; Mendes; Santos, 2004).

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 (Castro; Mendes; Santos, 2006).

Rosa et al. (2006) realizaram estudo a fim de empregar um preparado enzimático sólido obtido através de bioprocesso em estado sólido com o fungo filamentoso *Penicillium restrictum* contendo atividade lipásica de 29 U g^{-1} de torta fermentada para o tratamento de um efluente semissintético contendo gordura de leite em um sistema de lodos ativados. Foram realizados experimentos controle (sem o uso do preparado enzimático) e utilizando o preparado enzimático na proporção de 0,1% (p/v). Os percentuais de gordura adicionados nos sistemas variaram de 0 (zero) a 800 mg L^{-1} de óleos e graxas e os parâmetros avaliados foram a concentração de oxigênio dissolvido, a concentração de ácidos graxos livres (indicando a ação das lipases) e a DQO. A remoção de DQO no experimento controle foi 10% menor e a velocidade de acúmulo de gordura nos flocos foi 1,7 vez maior do que no biorreator adicionado do preparado enzimático. Quando foram adicionados 800 mg de óleos e gorduras por L de efluente, o sistema adicionado do preparado enzimático apresentou velocidade específica de consumo de oxigênio e constante de degradação maiores do que no sistema comum, demonstrando que o pré-tratamento enzimático de efluentes pode ser uma boa alternativa em sistemas de lodo ativado operando sob regime contínuo.

2.4 Aplicação de Lipases na Síntese de Ésteres de Ácidos Graxos

As lipases têm sido utilizadas na síntese orgânica de ésteres de ácidos graxos, os quais apresentam propriedades surfactantes, com aplicações em produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos (Carli, 2006; Paula; Barbosa; Castro, 2005). Produtos como triacilgliceróis, fosfolipídios, esteróides, aromatizantes e fragrâncias, apresentam em comum uma ligação éster, apesar das diferentes propriedades físicas e diversas estruturas químicas.

Sabeder et al. (2006) utilizaram lipases na produção de ésteres de frutose, os quais se caracterizam como surfactantes não-iônicos com elevado potencial emulsificante, estabilizante e detergente. Os ésteres de açúcares apresentam-se como bons emulsificantes para aplicações em emulsões do tipo água em óleo em produtos alimentícios, além de poderem atuar como agentes antibacterianos aplicáveis como aditivos alimentares. A Figura 1 apresenta a síntese de ésteres de frutose catalisada por lipases.

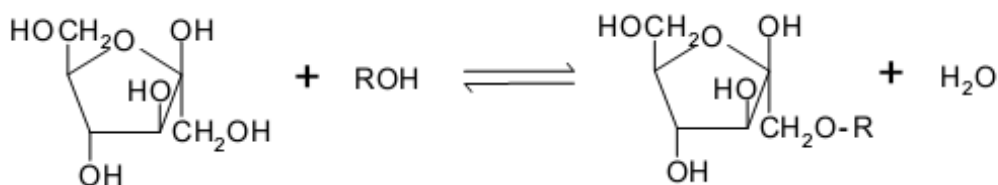


Figura 1 Síntese de ésteres de frutose catalisada por lipases.

Fonte: Sabeder et al. (2006)

O emprego das lipases imobilizadas em reações de esterificação e transesterificação em solventes orgânicos tem sido utilizado para a produção de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta, os quais apresentam aplicações como flavorizantes, como relatado por Salah et al. (2007), que realizaram a produção de butil acetato através da lipase produzida por *Rhizopus oryzae*. Kittikun et al. (2008) estudaram a produção de monoacilgliceróis a partir de oleína de palma e lipase obtida por *Pseudomonas* sp, sendo que os monoacilgliceróis são os emulsificantes mais utilizados na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos.

2.5. Produção de Biodiesel

A produção de biodiesel tem sido citada como uma das possíveis aplicações das lipases (Antczak et al., 2009; Dizge; Keskinler, 2008). O biodiesel tem ganhado importância nos tempos atuais devido à possibilidade de substituição de combustíveis fósseis. Os problemas ambientais relacionados com a emissão de gases decorrente do uso de combustíveis fósseis têm impulsionado pesquisas no sentido de desenvolvimento de combustíveis alternativos como o biodiesel (Dizge; Keskinler, 2008).

O biodiesel (metil ésteres de ácidos graxos) é produzido pela transesterificação de triacilgliceróis, conforme as equações químicas mostradas na Figura 2.

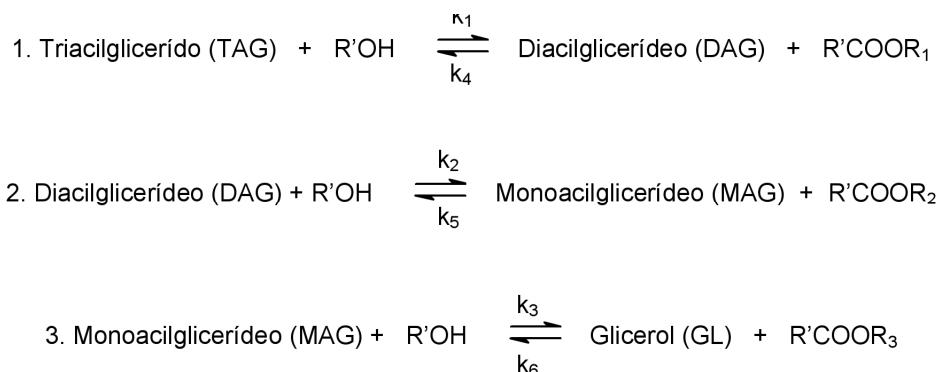


Figura 2 Reação de transesterificação de óleos vegetais com álcool formando ésteres e glicerol.
FONTE: Saad (2005)

O processo de produção comercial de biodiesel é fundamentalmente realizado por via química, mas a rota enzimática tem despertado grande interesse na comunidade científica. Um aspecto comum a estes processos é a busca pela otimização das condições de reação, de modo a lhes conferir características que os tornem viáveis e disponíveis para aplicações industriais. Entretanto, dentre algumas desvantagens essencialmente econômicas, o processo enzimático, uma vez otimizado, poderá apresentar vantagens muito interessantes em relação ao processo químico (Costa Neto, 2002), tais como: a facilidade de separação do catalisador; a obtenção de produtos mais puros e por permitir o uso de etanol hidratado na reação (Saad, 2005).

3. PRODUÇÃO DE LIPASES POR MICRORGANISMOS

As lipases microbianas são produzidas principalmente em cultivos submersos (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001), embora muitos autores mencionem os processos em estado sólido como uma alternativa viável para a produção de enzimas microbianas devido à simplicidade e economia do processo (Haq; Idrees; Rajoka, 2002).

As células imobilizadas têm sido utilizadas em alguns casos. Muitos estudos têm sido realizados a fim de definir as condições ótimas e os requerimentos nutricionais para a produção de lipases (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001).

A produção de lipases pode ser influenciada pelo tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio, pH do meio, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido no caso do bioprocessamento submerso (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001).

3.1. Efeito das Fontes de Carbono

As fontes de carbono comumente mencionadas em trabalhos de produção de lipases microbianas são azeites de oliva e palma, Tween 20 e 40, trioleína e tripalmitina, frutose, óleos de soja, girassol, algodão e milho. As fontes lipídicas de carbono parecem essenciais para a obtenção de elevados rendimentos, todavia, alguns autores têm produzido lipases na ausência de óleos e graxas

com bons rendimentos (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001). Dalmau et al. (2000) reportaram que a produção de lipases por espécies de *Candida* é inibida na presença de açúcares simples.

O azeite de oliva foi utilizado para a produção de lipases por células livres e imobilizadas de *Aspergillus niger* no estudo realizado por Ellaiah et al. (2004). Foram testadas concentrações de 0 (zero) a 1,25% de azeite de oliva, sendo as maiores atividades enzimáticas (UL^{-1}) obtidas na concentração de 1% da fonte de carbono, tanto pelas células livres como pelas imobilizadas. Já D'Annibale et al. (2006) estudaram a utilização de efluentes do processo de extração de azeite de oliva como substratos para a produção de lipases. Foram testados vários microrganismos, dentre os quais *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *Candida cylindracea*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium citinum*, *Rhizopus arrhizus* e *R. oryzae*. O microrganismo que apresentou os melhores resultados foi *C. cylindracea* NRRL Y-17506, o qual foi estudado como modelo. A produção de lipases foi afetada pela adição de fontes de carbono suplementares como o azeite de oliva e os óleos de soja e milho, na concentração de $3,0\text{ g L}^{-1}$. A adição do azeite de oliva aumentou a atividade enzimática de 1,24 para $9,0\text{ UI mL}^{-1}$, enquanto que a adição dos óleos de milho e soja resultou em atividades de 6,42 e $6,34\text{ UI mL}^{-1}$, respectivamente.

As fontes de carbono simples como glicose, galactose, frutose, xilose, sacarose, glicerol, sorbitol e manitol foram utilizadas por Lin et al. (2006) para a produção lipases por *Antrodia cinnamomea*, um basidiomiceto, em processos submersos. Os melhores resultados foram atingidos com os álcoois, de $26,69\text{ mU mL}^{-1}$ para o glicerol, $10,70\text{ mU mL}^{-1}$ para o sorbitol e $8,25\text{ mU mL}^{-1}$ para o manitol.

Haq et al. (2002) estudaram a produção de lipases por fungos através de bioprocessamento em estado sólido. Os microrganismos testados foram *Rhizopus oryzae*, *Mucor lipolytica*, *Rhizopus oligosporous*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus nigricans*, *Rhizopus arrhizum* e *Aspergillus wentii*. Dentre estes, o *R. oligosporous* apresentou a máxima atividade lipolítica nos testes preliminares, de 30 U g^{-1} . Como substratos para a produção de lipases foram testadas as farinhas de amêndoa, coco, mostarda e soja, a casca de arroz e o farelo de trigo. Os melhores resultados foram obtidos com a farinha de amêndoas, devido a apresentar os maiores percentuais de óleos dentre as fontes de carbono estudadas, bem como por ser boa fonte de proteínas, carboidratos e cinzas.

O óleo de gergelim foi utilizado na concentração de 0,5% como fonte de carbono para a produção de lipases pelo microrganismo *Fusarium solani* em bioprocessamento submerso, tendo apresentado o melhor resultado de atividade enzimática ($0,88$ ou $0,45\text{ U mg}^{-1}$ de proteína) dentre os óleos testados (trioleína, coco, milho, palma e oliva). O óleo de gergelim, embora tenha levado aos melhores resultados em atividade enzimática, apresentou as menores quantidades de proteína extracelular (o que indica maior atividade por unidade de proteína) e as menores concentrações de biomassa, o que seria uma vantagem comercial da produção (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001).

A síntese de enzimas por bioprocessamento em estado sólido é realizada utilizando-se, principalmente, resíduos agroindustriais, tais como farelo de trigo, sabugo de milho, casca de manga, torta de babaçu, farelo de amendoim, dentre outros. Estes resíduos podem, em alguns casos, apresentar tanto a função de suporte para crescimento do microrganismo, como fonte de carbono e/ou indutor para a síntese enzimática. O resíduo pode ser também utilizado apenas como suporte do crescimento dos fungos (Damaso et al., 2005). Com o intuito de investigar o efeito do uso do farelo de trigo e do sabugo de milho como suporte para a produção de lipase por *Aspergillus niger*, Damaso et al. (2005) realizaram a adição do azeite de oliva em diferentes concentrações, tendo a função de fonte de carbono e indutor da síntese de lipases. O melhor resultado foi obtido com farelo de trigo como suporte e 2% de azeite de oliva ($10,7\text{ U mL}^{-1}$). Os autores ainda testaram a possibilidade de

substituição do azeite de oliva por resíduos da indústria do óleo de milho. O farelo de trigo foi mantido como suporte e os resíduos foram adicionados ao meio na concentração de 4%, sendo eles a borra, a estearina e ácidos graxos. Verificou-se que os subprodutos do refino do óleo de milho podem ser utilizados como fonte de carbono e indutores do processo de síntese de lipases. As melhores atividades foram obtidas com a borra e a estearina, de 13,8 U mL⁻¹ e 8,3 U mL⁻¹. O uso do ácido graxo inibiu significativamente a síntese de lipases, provavelmente por ser o produto da hidrólise de fontes lipídicas, fenômeno que ocorre quando a síntese da enzima se dá pelo processo de indução/repressão.

Cordova et al. (1998) estudaram a produção de lipases em FES utilizando bagaço de cana-de-açúcar e torta de oliva (um resíduo do processo de extração de azeite de oliva) como substratos. A torta de oliva e o bagaço de cana apresentaram efeito sinérgico na produção de lipases, demonstrando que substratos de baixo custo, considerados resíduos, podem ser utilizados para este fim.

3.2 Efeito das Fontes de Nitrogênio

As fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas podem ser utilizadas para a produção de lipases. As fontes orgânicas podem ser a peptona, água de maceração de milho, farinha de soja, aminoácidos, triptona, extrato de levedura e ureia. As fontes inorgânicas como os sais de amônio (sulfatos, fosfatos, cloretos), nitratos e nitritos podem ser utilizados, embora os melhores rendimentos em lipases tenham sido obtidos através de fontes orgânicas de nitrogênio, tais como peptona, extrato de levedura e torta de soja. O sulfato de amônio apresentou resultados negativos em alguns trabalhos. Entretanto, a produção de lipases foi incrementada quando o sulfato de amônio foi associado a fontes de nitrogênio orgânicas (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001).

Fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas foram utilizadas para a produção de lipases em bioprocessos submersos por um basidiomiceto. As fontes comparadas foram adicionadas ao meio na concentração de 0,5%, sendo elas: triptona, peptona, caseína, glicina, prolina, glutamina, asparagina, cloreto de amônio, sulfato de amônio, oxalato de amônio, acetato de amônio, nitratos de sódio e nitrito de sódio. Os melhores resultados foram obtidos com os aminoácidos asparagina (6,41 mU mL⁻¹), glicina (5,36 mU mL⁻¹) e glutamina (4,74 mU mL⁻¹) e com a triptona (4,77 mU mL⁻¹) (Lin; Wang; Sung, 2006).

Há casos em que a fonte de nitrogênio utilizada no meio de cultivo influencia os níveis de atividade da fonte de carbono, o que foi demonstrado por Falony et al. (2006), os quais otimizaram um meio de cultivo para a produção de lipases via FES pelo fungo *Aspergillus niger*. O farelo de trigo foi utilizado como suporte para o crescimento do fungo, a glicose como fonte de carbono, o azeite de oliva como indutor da produção de lipase e como fontes de nitrogênio o sulfato de amônio e a ureia. A fim de otimizar o meio de cultivo para a síntese enzimática foram realizados três planejamentos Experimentais do tipo Box-Behnken, sendo as variáveis experimentais a concentração de glicose, a umidade do meio de cultivo e a concentração de azeite de oliva. O primeiro conjunto de experimentos foi realizado utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, o segundo com ureia e o terceiro com uma mistura das duas fontes, de forma que o nitrogênio fosse fornecido em iguais quantidades pelas duas fontes. O primeiro planejamento apresentou como variáveis significativas a umidade e o azeite de oliva, sendo a máxima atividade enzimática obtida de 7,44 U g⁻¹ nas condições de 2,81% de glicose, 65% de umidade e 4,5% de azeite de oliva. Com a utilização da ureia como fonte de nitrogênio, as três variáveis resultaram significativas, sendo a máxima atividade enzimática obtida de

7,76 U g⁻¹ nas condições de 1,5% de glicose, 65% de umidade e 1,5% de azeite de oliva. Quando ureia e sulfato de amônio foram utilizadas simultaneamente como fontes de nitrogênio, somente a umidade resultou significativa na análise dos resultados do planejamento. A máxima atividade lipásica obtida foi de 9,14 U g⁻¹, nas condições de 1,5% de glicose, 65% de umidade e 1,5% de azeite de oliva.

3.3 Efeito dos Micronutrientes

A suplementação dos meios de cultivo com uma solução de minerais contendo ZnSO₄, Fe₂SO₄.7H₂O, Fe(NH₄)₂SO₂, CuSO₄.7H₂O, MnSO₄.H₂O, H₃BO₃ e Na₂MoO₄.2H₂O ocasionou aumento de três vezes na atividade enzimática dos meios contendo os óleos de gergelim e oliva, e de quatro vezes no meio contendo óleo de milho. Os elementos traços são geralmente componentes estruturais das enzimas. Íons como Mg, Fe, Ca, Cu, Co, Na, K, Mn e Zn parecem influenciar positivamente a produção de lipases (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001). Lin et al. (2006) reportaram que a adição de Ca, Mg, Fe, Na e K aumentaram a produção de lipase, enquanto Cu, Zn e Li apresentaram efeito inibitório na produção da enzima.

3.4 Efeito das Condições Ambientais

Haq et al. (2002) estudaram temperaturas de cultivo de 25 a 45°C para a produção de lipases pelo microrganismo *R. oligosporous* por bioprocessamento em estado sólido. Os melhores resultados foram obtidos a 30°C. Em altas e baixas temperaturas a energia requerida para a manutenção do microrganismo aumenta, diminuindo a formação de produtos. O pH inicial ótimo dos cultivos foi de 6,0. Os pHs iniciais de 5,5; 8,0 e 7,0 foram reportados como ótimos para os cultivos de *A. cinnamomea*, *R. glutinis* e *C. rugosa*, respectivamente (Lin; Wang; Sung, 2006). As temperaturas na faixa de 26,5 °C a 32 °C foram utilizadas em inúmeros trabalhos de pesquisa de produção de lipases, sendo 30°C a temperatura utilizada com maior frequência. Os microrganismos utilizados variaram desde fungos, leveduras e bactérias. Quanto ao pH, foram utilizados pHs de 6,0 a 7,0 na maioria dos trabalhos revisados (Lin; Wang; Sung, 2006; Damaso et al., 2005; Falony et al., 2006; Armas; Mendoza; Jústiz, 2005; Baron et al., 2005; Fernandes et al., 2005; Gutarra et al., 2005; Pozza et al., 2005; Yang et al., 2005; Burkert; Maugeri; Rodrigues, 2004; Tan et al., 2003).

Elibol e Ozer (2002) relataram a importância da transferência de oxigênio na produção de lipases por *Rhizopus arrhizus* via bioprocessamento submerso, sendo que a implementação da transferência de oxigênio através de agitação e inserção de ar é um importante fator para a produção de lipases por microrganismos, em especial fungos filamentosos.

Cavalcanti et al. (2005) estudaram a influência da temperatura e do fluxo de ar na produção de lipases por bioprocessamento em estado sólido em reatores de leito fixo e relataram a importância de elevados fluxos de ar nestes sistemas (fluxos de 0,8 L min⁻¹ ocasionaram as maiores produtividades), principalmente com o objetivo de remoção do calor gerado, já que a transferência de ar não constituiu-se como um fator crítico em bioprocessos em estado sólido.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que as lipases apresentam inúmeras aplicações industriais, sendo as mais recentes a síntese de aromas e compostos com atividades surfactantes, bem como a aplicação na bionergia, com a produção de biodiesel.

Os fungos filamentosos, dentre os microrganismos produtores, possuem maior potencial de produção de lipases, havendo a necessidade de estudar novos substratos, especialmente de mais baixo custo, e de selecionar-se novas cepas produtoras, a fim de reduzir os custos de produção.

Dentre os fatores que influenciam a produção de lipases, os métodos de cultivo são bastante estudados, devendo-se dar atenção especial à fermentação em estado sólido, uma vez que a produção atual está baseada nos cultivos submersos, embora os fungos filamentosos possam apresentar maiores produtividades através da fermentação em estado sólido.

As fontes de carbono e nitrogênio apresentam importância na produção, sendo utilizados principalmente óleos vegetais como fonte de carbono e fontes de nitrogênio orgânicas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMAS, J.C.; MENDOZA, J.C.D.; JÚSTIZ, O.H. Lipase expression by *Mucor griseocyanus* cultures on different substrates, In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, Recife, 2005.

BARON, A.M.; TURRA, V.M.Z.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Produção e caracterização de lipases de *Penicillium corylophilum* IOC 4211. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, Recife, 2005.

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

CARLI, I.C. Síntese de ésteres derivados de carboidratos com propriedades surfactantes utilizando lipases imobilizadas em suporte sólido. Dissertação de Mestrado em Química – Universidade Regional de Blumenau. Blumenau- SC, 2006.

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

CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. Química Nova, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 22-24, 2003

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

CORDOVA, J.; MEMMAOUI, M.; ISMAILI-ALAOUI, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and

sugar cane bagasse. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.5, p. 75-78, 1998.

COSTA, V. E. U.; AMORIN, H. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. *Química Nova*, São Paulo, v. 22, n. 6, p. 112-120, 1999.

D'ANNIBALE, A., SERMANI, G.G., FEDERICI, F., PETRUCCIOLI, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 15, p. 1828-1833, 2006.

DALMAU, E.; MONTESINOS, J.L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon source on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 23, p. 657-663, 2000.

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. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, Recife, 2005.

DE PAULA, A.V.; BARBOZA, J.C.S.; CASTRO, H.F. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. *Química Nova*, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 792-796, 2005.

ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rizopus arhizus*. *Process Biochemistry*, v. 36, p. 325-329, 2000.

ELLAIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMADRISHNA, B.; THAER TALEB, A.; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 525-528, 2004.

FALONY, G.; MENDONZA, J.C.D.; ARMAS, J.C. Obtention of *A. niger* lipases by solid state fermentation. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, Recife, 2005.

FERNANDES, M.L.; MEIRA, J.A.; MITCHELL, D.A. KRIEGER, N. Produção da lipase de *Bacillus megaterium* por PES para aplicação em biocatálise. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, Recife, 2005

FURLONG, E.B. *Bioquímica: um enfoque para alimentos*. Rio Grande: Edgraf, 2000.

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

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

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

JANSSEN, P.H.; MONK, C.R.; MORGAN, H.W. A thermophilic, lipolytic *Bacillus sp.* And continuous assay of its p-nitro-phenyl-palmitate esterase activity. FEMS Microbiology Letters, v. 120, p. 95–200, 1994.

JUNG, F. B. *et al.* Tratamento de Efluentes com Elevado Teor de Gordura: Enzimas/ Lodo ativado. CD Rom, In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA. Natal, RN, 2002.

LARIOS A.; GARCIA, H.S.; OLIART R.M.; VALERIO-ALFARO G. Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antártica* lipase. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 65, p. 373–376, 2004.

LI, C.Y.; CHENG, C.Y.; CHENG, T.L.. Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source. Biochemical Engineering Journal. v. 19, p. 25–31, 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, p. 98-102, 2006.

MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. Process Biochemistry, v. 38, p. 715-721, 2002.

MAIA, M.M.D.; HEASLEY, A.; CAMARGO, M.M.M.; MELO, E.H.M.; MORAIS JR., M.A.; LEDINGHAM, W.M.; LIMA FILHO, J.L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. Bioresource Technology, v. 76, p. 23-27, 2001.

MALDONADO, R. R. Produção, purificação e caracterização da Lipase de *geotrichum candidum* obtida a partir de Meios industriais: 2006. Disponível em <[http:// www.fea.unicamp.br](http://www.fea.unicamp.br)>. Acesso em: 03/04/2007 às 18:00 h.

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

PANDEY, A. Solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, v. 13, p. 81-84, 2003.

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.

PAQUES, F.W.; MACEDO, G.A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. Química Nova, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006

PASTORE, G.M. Fermentação por fungos filamentosos, produção, purificação e aplicação de enzimas microbianas. Curso Fermentation Technology, Módulo II, UFSC, 2000.

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. In: XV Simpósio Nacional de Fermentações, Recife, 2005.

PRAZERES, J.N. Produção, purificação e caracterização da lipase alcalina de *Fusarium oxysporum*. Base Alimentarium- BIBFEA. Disponível em : <<http://www.feunicamp.br/alimentarium>>

RAO, P.V.; JAYARAMAN, K.; LAKSAHMANAN, C.M. Production of lipase by *Candida rugosa* in solid state fermentation. 1: Determination of significant process variables. Process Biochemistry, v. 31, p. 669-78, 1993.

ROSA, D.R.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. Tratamento biológico/enzimático de efluente com alto teor de gordura. In: XV Simpósio Nacional de Fermentações, Recife, 2005

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

SHARON, C.; FURUGOH, S.; YAMAKIDO, T.; OGAWA, H.; KATO, Y. Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. J Ind Microbiol Biotechnol, v. 20, p. 304-307, 1998.

SIDHU, P.; SHARMA, R.; SONI, S.K.; GUPTA, J.K. Production of extracellular alkaline lipase by a new thermophilic *Bacillus* sp. Folia Microbiol., v. 43, p. 51-4, 1998.

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.

UL-HAQ, I.; IDREES, S.; RAJOKA, M.I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. Process Biochemistry, v. 37, p. 637-341, 2002.

VARGAS, G.D.L.P. Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato. Dissertação de Mestrado, URI, 2004.

YANG, X.; WANG, B.; CUI, F.; TAN, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. Process Biochemistry, v. 40, p. 2095-2103, 2005.