



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RAFAEL RESENDE MALDONADO

**APLICAÇÃO DA LIPASE DE *GEOTRICHUM CANDIDUM*  
PARA BIOCATÁLISE DE ÓLEOS VEGETAIS COM VISTAS  
À PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

**Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Isabel Rodrigues**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gabriela Alves Macedo**

**APPLICATION OF LIPASE FROM *GEOTRICHUM CANDIDUM* TO  
BIOCATALYSIS OF VEGETABLE OILS TO BIODIESEL PRODUCTION**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

*Doctorate thesis to the Food Engineering Postgraduation Programme of the School of Food Engineering of the University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Food Engineering.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO RAFAEL RESENDE MALDONADO E ORIENTADA PELA PROF. DRA. MARIA ISABEL RODRIGUES  
Assinatura do Orientador

---

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE  
DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Maldonado, Rafael Resende  
M293a Aplicação da lipase de *Geotrichum candidum* para biocatálise de  
óleos vegetais com vistas à produção de biodiesel / Rafael Resende  
Maldonado. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Maria Isabel Rodrigues.  
Coorientador: Gabriela Alves Macedo.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade  
de Engenharia de Alimentos.

1. Lipase. 2. Biodiesel. 3. Hidrólise. 4. Esterificação. 5.  
Transesterificação. I. Rodrigues, Maria Isabel. II. Macedo, Gabriela  
Alves. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Application of lipase from *Geotrichum candidum* to  
biocatalysis of vegetable oils to biodiesel production

Palavras-chave em inglês:

Lipase

Biodiesel

Hydrolysis

Esterification

Transesterification

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Maria Isabel Rodrigues [Orientador]

Aloísia Laura Moretto

Elizama Aguiar de Oliveira

Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves

Luciana Francisco Fleury

Data da defesa: 24-08-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia de Alimentos

## BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Isabel Rodrigues (DEA/FEA/Unicamp)

Orientadora

Membro titular

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Aloísia Laura Moretto (Faculdades Integradas Maria Imaculada)

Membro titular

---

Dr<sup>ª</sup>. Elizama Aguiar de Oliveira (DEA/FEA/Unicamp)

Membro titular

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves (DCA/FEA/Unicamp)

Membro titular

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Francisco Fleury (IBB/Unesp)

Membro titular

---

Prof. Dr. Eduardo Augusto Caldas Batista (DEA/FEA/Unicamp)

Membro suplente

---

Dr<sup>ª</sup>. Fátima Aparecida de Almeida Costa (DEA/FEA/Unicamp)

Membro suplente

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert (FURG)

Membro suplente

Dedico este trabalho a minha mãe, *Ercília*, que desde quando ainda estava grávida de mim, sonhou e desejou que um dia eu tivesse este título. Desde sempre foi ela que trabalhou intensamente e me inspirou a percorrer tão longa e vitoriosa jornada.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha mãe pelo amor, amizade e dedicação incondicionais durante toda minha vida, sempre me incentivando e me inspirando para ir além e que só através da educação e do conhecimento pode-se fazer um mundo melhor. Agradecer pelas noites mal dormidas, pelas horas exaustivas em que trabalhou para prover meu sustento, pelas lágrimas derramadas e a imensa saudade de vivermos longe. Por cada minuto em que desejou e lutou por minha felicidade e realização pessoal e profissional.

A meu pai, com muita saudade, pelo carinho, amizade e serenidade que me transmitiu durante toda sua vida.

A Bel, pelo carinho, pela orientação e por todo amor dedicado ao longo de mais de treze anos de trabalho. Ela que me acolheu, me adotou quando eu ainda era apenas um ingressante na Graduação e que me guiou pelos caminhos acadêmicos até eu me tornar Doutor, passando por inúmeras fases, boas ou ruins, mas sempre companheira e amiga.

A Gabriela por acreditar em meu trabalho e pelas inestimáveis contribuições para que este projeto se concretizasse. Por cada conversa que se iniciava com inúmeras dúvidas e terminavam com uma infinidade de idéias e possibilidades a serem exploradas.

Aos meus amigos e familiares que me apoiaram, que ouviram minhas angústias e que comemoraram comigo cada passo, cada vitória nesta longa jornada.

A antigos professores que me ensinaram, apoiaram e que souberam dizer a palavra certa para que eu sempre seguisse em frente, em especial as professoras Geralda, Marta, Jussara e Heloísa.

Aos meus colegas de laboratório pela convivência e colaboração na realização deste trabalho. Em especial aos meus alunos de iniciação científica André, Felipe e Gabriela que tanto me ajudaram neste projeto e a minha colega e amiga Elizama que tanto me ouviu e me ajudou ao longo deste mais de cinco anos.

A FEA, Unicamp e CNPq por terem me provido os meios necessários para realizar este trabalho e aos membros da banca examinadora pelas preciosas sugestões dadas.

A Deus, por ter me dado a oportunidade de trilhar tão belo caminho, de conhecer pessoas tão maravilhosas e por ter superado tantos desafios para chegar a este momento tão especial.

*“Nada pode ser mais transformador que o conhecimento utilizado em prol do bem comum.”*

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| RESUMO.....  | 1  |
| SUMMARY.....   | 2  |
| CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL .....  | 3  |
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 3  |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 7  |
| 2.1. Produção de lipases .....   | 7  |
| 2.2. Imobilização enzimática .....   | 11 |
| 2.3. Produção de biodiesel .....   | 15 |
| 3. FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE TRABALHO.....  | 20 |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 21 |
| CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE MICRORGANISMOS<br>PRODUTORES DE LIPASE .....     | 29 |
| Lipase production from different microorganisms using agro industrial by-products..... | 29 |
| ABSTRACT .....   | 30 |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 31 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 32 |
| 2.1. Avaliação da produção de lipase por fungos do gênero <i>Geotrichum</i> .....      | 32 |
| 2.2. Avaliação da produção de lipase por leveduras silvestres .....                    | 33 |
| 2.3. Avaliação da produção de lipase por <i>Fusarium oxysporum</i> .....               | 34 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 35 |
| 3.1. Avaliação da produção de lipase por fungos do gênero <i>Geotrichum</i> .....      | 35 |
| 3.2. Avaliação da produção de lipase por leveduras silvestres .....                    | 37 |
| 3.3. Avaliação da produção de lipase por <i>Fusarium oxysporum</i> .....               | 42 |
| 4. CONCLUSÃO .....   | 44 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 45 |
| 6.   |    |

|   |    |
|---|----|
| Capítulo III – Estudo da produção de lipase por <i>Geotrichum</i> sp. ....                                  | 48 |
| Improvement of lipase production from <i>Geotrichum</i> sp. in shaken flasks .....                          | 48 |
| ABSTRACT .....  | 49 |
| 1. INTRODUCTION .....   | 50 |
| 2. MATERIALS AND METHODS .....  | 51 |
| 2.1. Strain and cultivation conditions .....  | 51 |
| 2.2. Lipase assay .....   | 52 |
| 2.3. Screening variables of inoculum and medium composition .....   | 52 |
| 2.4. Experimental validation of maximized lipase production .....   | 52 |
| 3. RESULTS AND DISCUSSION .....   | 53 |
| 3.1. Screening variables of inoculum and medium composition .....   | 53 |
| 3.2. Experimental validation of optimized conditions .....  | 56 |
| 4. CONCLUSION .....   | 59 |
| 5. ACKNOWLEDGMENTS .....  | 59 |
| 6. REFERENCES .....   | 59 |
| Capítulo IV – Purificação parcial e imobilização da lipase de <i>Geotrichum candidum</i><br>NRRLY-552 ..... | 62 |
| Partial purification and immobilization of lipase from <i>Geotrichum candidum</i> NRRLY-<br>552.....        | 62 |
| ABSTRACT .....  | 63 |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 64 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 65 |
| 2.1. Precipitação da lipase com sulfato de amônio .....   | 65 |
| 2.2. Liofilização direta do caldo fermentado .....  | 66 |
| 2.3. Precipitação da lipase com etanol .....  | 66 |
| 2.4. Determinação da atividade lipolítica e de outros parâmetros dos preparados<br>enzimáticos .....        | 66 |

|   |    |
|---|----|
| 2.5. Determinação da estabilidade dos preparados enzimáticos na presença de solventes orgânicos .....                   | 67 |
| 2.6. Imobilização enzimática da lipase de <i>Geotrichum candidum</i> NRRLY-552 em alginato de cálcio .....              | 67 |
| 2.7. Imobilização enzimática da lipase de <i>Geotrichum candidum</i> NRRLY-552 em nióbio grafite .....                  | 68 |
| 2.8. Imobilização enzimática da lipase de <i>Geotrichum candidum</i> NRRLY-552 em zeólita .....                         | 68 |
| 2.9. Imobilização enzimática da lipase de <i>Geotrichum candidum</i> NRRLY-552 em Celite .....                          | 69 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 69 |
| 3.1. Purificação da enzima .....  | 69 |
| 3.2. Estabilidade dos preparados enzimáticos na presença de solventes orgânicos.....                                    | 73 |
| 3.3. Imobilização enzimática .....  | 77 |
| 4. CONCLUSÃO .....  | 81 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 81 |
| <br>Capítulo V – Hidrólise enzimática de óleos vegetais utilizando lipase de <i>Geotrichum candidum</i> NRRLY-552 ..... | 85 |
| <br>Hydrolysis of vegetable oils catalysis by lipase from <i>Geotrichum candidum</i> NRRLY-552 .....                    | 85 |
| <br>ABSTRACT .....  | 86 |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 87 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 88 |
| 2.1. Ensaio preliminares .....  | 88 |
| 2.2. Estudo da hidrólise enzimática de óleo de soja em frascos agitados .....   | 90 |
| 2.3. Estudo da influência da temperatura na hidrólise enzimática do óleo de soja em frascos agitados .....              | 91 |

|  |     |
|--|-----|
| 2.4. Estudo da influência da concentração enzimática na hidrólise enzimática do óleo de soja em frascos agitados .....                 | 91  |
| 2.5. Estudo da hidrólise enzimática de diferentes óleos vegetais em frascos agitados .....   | 92  |
| 2.6. Estudo da hidrólise enzimática do óleo de soja em reator encamisado .....   | 92  |
| 2.7. Determinação da taxa de hidrólise .....   | 92  |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 93  |
| 3.1. Resultados preliminares .....   | 93  |
| 3.2. Estudo da hidrólise enzimática de óleo de soja em frascos agitados .....  | 96  |
| 3.3. Estudo da influência da temperatura na hidrólise enzimática do óleo de soja em frascos agitados .....                             | 104 |
| 3.4. Estudo da influência da concentração enzimática na hidrólise enzimática do óleo de soja em frascos agitados .....                 | 105 |
| 3.5. Estudo da hidrólise enzimática de diferentes óleos vegetais em frascos agitados .....   | 110 |
| 3.6. Estudo da hidrólise enzimática do óleo de soja em reator encamisado .....   | 112 |
| 4. CONCLUSÃO .....   | 113 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 114 |
| Capítulo VI – Esterificação e transesterificação enzimática do óleo de soja utilizando <i>Geotrichum candidum</i> .....                | 116 |
| Esterification and transesterification reactions of vegetable oils catalysis by lipase from <i>Geotrichum candidum</i> NRRLY-552 ..... | 116 |
| ABSTRACT .....   | 117 |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 118 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 121 |
| 2.1. Esterificação de ácidos graxos com etanol .....   | 121 |
| 2.2. Transesterificação do óleo de soja com etanol .....   | 122 |
| 2.3. Métodos cromatográficos para identificação de ácidos graxos e ésteres .....   | 122 |

|   |     |
|---|-----|
| 2.3.1. Cromatografia em camada delgada .....                              | 122 |
| 2.3.2. Cromatografia gasosa .....   | 123 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 123 |
| 4. CONCLUSÃO .....  | 135 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                       | 135 |
| Capítulo VII – CONCLUSÃO GERAL.....                                       | 139 |
| SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....                                    | 142 |
| ANEXO I – TRABALHOS PUBLICADOS AO LONGO DA REALIZAÇÃO DESTE PROJETO ..... | 143 |

## RESUMO

A crescente necessidade por energia e o avanço das preocupações com problemas ambientais devido ao uso de combustíveis fósseis tem levado a busca de alternativas para a área energética. Dentro deste contexto, a produção de biocombustíveis como etanol e biodiesel mostram um grande potencial de avanço e despertam amplo interesse na área de pesquisas. O biodiesel é comumente obtido por reações de transesterificação com catálise alcalina, no entanto a via enzimática constitui-se em uma forma promissora para a produção deste tipo de combustível. Este trabalho analisou as etapas de produção, purificação e imobilização da lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 e aplicação dessa enzima na biocatálise das reações de hidrólise, esterificação e transesterificação de óleos vegetais em diferentes sistemas reacionais. Os resultados obtidos demonstraram que a lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 pode ser obtida a baixo custo, com a utilização de um resíduo agro-industrial (água de maceração de milho) com atividade lipolítica de cerca de 20 U/mL. A purificação parcial desta enzima foi realizada por dois métodos – precipitação com sulfato de amônio e precipitação com etanol, seguido de liofilização em ambos os casos. Tais métodos proporcionaram a obtenção de um preparado enzimático com atividade lipolítica de cerca de 500 U/g em duas ou três etapas. O pequeno número de etapas e a elevada atividade enzimática propiciam a aplicação desta enzima para biocatálise de reações com óleos vegetais para uso na produção de biocombustíveis. A enzima selecionada apresentou um bom desempenho para a reação de hidrólise de óleos vegetais, atingindo taxas de hidrólise de cerca de 80% após 24 horas de reação, em frascos agitados a 210 rpm, 45°C e 15% m/m de água no meio reacional com uma concentração de enzima de 5% m/m da lipase. A enzima não apresentou ação de esterificação suficiente para produção de biodiesel na presença de etanol, no entanto o sistema reacional desenvolvido permite que a associação com outras lipases de boa ação de esterificação possibilite a obtenção do biodiesel a partir do hidrolisado obtido neste trabalho.

## SUMMARY

The growing energy necessity and the advancement of environmental concerns due to the use of fossil fuels have led the search for alternatives to the energy area. In this context, the production of biofuels like ethanol and biodiesel shows a great potential for advancement and arouse widespread interest in the area of research. Biodiesel is commonly obtained by transesterification with alkaline catalysis; however, the enzymatic pathway is a promising way to produce this type of fuel. This work studied the stages of production, purification and immobilization of lipase from *Geotrichum candidum* NRRLY-552 and application of this enzyme in the biocatalysis of the hydrolysis, esterification and transesterification of vegetable oils in different reaction systems. The results showed that the lipase from *Geotrichum candidum* NRRLY-552 can be obtained at a low cost, using a residue of the agro-industrial (corn steep liquor), with lipolytic activity of about 20 U/mL. Partial purification of this enzyme was performed by two methods - precipitation with ammonium sulphate and precipitation with ethanol, followed by lyophilization in both cases. Such methods provided to obtain an enzyme preparation with lipolytic activity of 500 U/g in two or three steps. The small number of steps and the high enzyme activity provide the application of this enzyme to catalysis of reactions with vegetable oils for the use in biofuel production. The selected enzyme showed a good performance for the hydrolysis of vegetable oils, reaching rates of hydrolysis of about 80% after 24 hours of reaction, in shaken flasks at 210 rpm, 45°C and 15% w/w of water in the reaction with enzyme concentration of 5% w/w of the lipase. The enzyme did not show enough action esterification for biodiesel production in presence of ethanol; however, the reaction system developed permits the association with other lipases with good deed esterification with allows obtainable biodiesel from the hydrolysed produced in this work.

## CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL

### 1. INTRODUÇÃO

Com exceção da energia hidrelétrica e da nuclear, a maior parte da necessidade mundial de energia é suprida através de fontes petroquímicas, carvão e gases naturais, que são limitadas e que deverão se esgotar economicamente no futuro. Especificamente para os países em desenvolvimento, o crescente consumo de energia gera uma grande dependência em relação aos combustíveis fósseis como carvão, petróleo e gás. O aumento dos preços destes combustíveis no curto prazo e diminuição das reservas desses combustíveis torna inevitável a busca de combustíveis alternativos para suprir a demanda dos setores de transporte, geração de energia elétrica, agricultura dentre outros. Biodiesel tem sido visto como um substituto para o diesel por diversos motivos, dentre eles o menor impacto ambiental, a possibilidade de utilização de matérias-primas vegetais e animais como óleos e gorduras, a facilidade de realização da reação de obtenção e a menor viscosidade do produto em relação aos óleos vegetais (Dwivedi, Jain & Sharma, 2011).

Os óleos vegetais têm atraído atenção como uma fonte renovável com potencial para a produção de combustíveis alternativos ao diesel derivado do petróleo, porém o uso direto de óleos vegetais e/ou suas misturas em motor diesel de injeção direta ou indireta é geralmente considerado não satisfatório e impraticável, devido principalmente a problemas como alta viscosidade, composição ácida, teor de ácidos graxos livres, formação de gomas devido à oxidação e polimerização durante o armazenamento, combustão e a deposição de carbono, que comprometem o processo de ignição e a vida útil do motor a diesel. As quatro principais técnicas utilizadas para solucionar o problema da alta viscosidade são a diluição dos óleos vegetais em solventes, a micro-emulsificação, a pirólise e a transesterificação, sendo esta última a mais promissora nos dias atuais (Demirbas, 2005; Fukuda, Kondo & Noda, 2001).

O biodiesel é definido como um mistura de monoalquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, preferencialmente metil e etil ésteres, derivados de fontes renováveis, como óleos vegetais e gordura animal. A principal forma de obtenção destes ésteres é através da

reação de transesterificação que faz a conversão de ésteres de ácidos graxos e monoalquil ésteres pela reação direta com álcool. O caminho mais utilizado na obtenção do biodiesel ainda é pela reação de óleos vegetais com metanol, reagente que apresenta baixo custo, mas que oferece uma série de inconvenientes em sua utilização. É necessária uma grande quantidade de metanol para deslocar o equilíbrio da reação no sentido da formação dos produtos; o metanol precisa ser anidro quando se utiliza catálise ácida ou básica e/ou quando se utiliza um óleo com alto teor de ácido graxo livres, pois há a possibilidade de formação de sabões nestes casos. Vários fatores influenciam no processo de transesterificação ou alcóólise, tais como tipo de catalisador (ácido, básico ou enzimático), razão molar álcool/óleo, temperatura, teor de água e de ácidos graxos livres, dentre outros (Demirbas, 2008).

Vieira, Silva e Langone (2002) citam como vantagem do biodiesel o fato dele ser obtido a partir de recursos renováveis (óleos vegetais), que propiciam um balanço de dióxido de carbono favorável (consumo de dióxido de carbono durante a cadeia produtiva do biodiesel é maior do que a quantidade emitida durante a combustão do mesmo). O impacto ambiental também é reduzido pela diminuição na emissão de óxidos de enxofre, uma vez que os óleos vegetais são praticamente isentos de conteúdo de enxofre. Demirbas (2005) cita também que o biodiesel é um substituto renovável do diesel de petróleo, com características muito similares, mas com geração de menor quantidade de gases de exaustão, sendo um combustível biodegradável, não tóxico e praticamente livre de compostos de enxofre e aromáticos. Além disso, ele pode ser obtido a partir de mais de 350 tipos de óleos vegetais, sendo os mais promissores os de girassol, soja, algodão, canola e amendoim.

Atualmente, o biodiesel tem sido produzido na Europa e nos Estados Unidos com o emprego de catalisadores básicos ou ácidos usando óleos vegetais. No entanto, o processo alcalino convencional consome grande quantidade de energia e gera produtos indesejáveis, como sabões, o que dificulta a etapa de purificação do combustível. Particular atenção vem sendo dada à utilização de lipases como biocatalisadores para a obtenção de biodiesel

devido aos altos rendimentos, facilidade de purificação e ausência de produtos indesejáveis (Gog et al., 2012).

As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas com grande ocorrência em plantas, animais e micro-organismos. Sua função biológica é catalisar a hidrólise de óleos e gorduras, fornecendo ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Esta reação é reversível, pois as lipases também catalisam a formação de acilgliceróis a partir de ácidos graxos e glicerol na interface óleo-água (Hatzinikolaou et al., 1996). Dessa forma, tais enzimas podem ser utilizadas na produção de biodiesel, seja através da esterificação de ácidos graxos livres com reagente alcoólico ou da transesterificação dos óleos vegetais, pela substituição do grupo glicerol por grupos metílicos ou etílicos na constituição do éster. A Figura 1 mostra de forma esquemática as reações de transesterificação e de hidrólise dos triacilgliceróis, principal componente de óleos vegetais e gorduras.

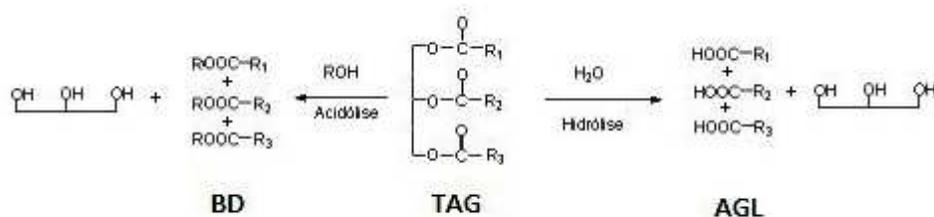


Figura 1 – Esquema das reações de alcóólise ou transesterificação e de hidrólise de óleos vegetais (TAG = triacilglicerol; BD = biodiesel – éster de cadeia curta de ácido graxo; AGL = ácido graxo livre).

Apesar das vantagens proporcionadas pela utilização de lipases em processos industriais, existem também os aspectos negativos, dentre eles, o alto custo das enzimas e a inativação das lipases pelo contato com o álcool e o glicerol (Gog et al., 2012) e a necessidade de matérias-primas com baixo teor de água e de ácidos graxos livres (Demirbas, 2008) são aspectos técnicos que devem ser considerados. Do ponto de vista econômico, o uso intensivo de óleos vegetais pode ocasionar disputa com a indústria

alimentícia, afetando a disponibilidade e causando flutuações de preços nas matérias-primas, com impacto no preço final do biocombustível, o que leva à necessidade de desenvolver novas tecnologias de obtenção dessas matérias-primas e de fontes oleaginosas não utilizáveis pela indústria alimentícia (Santori et al., 2012). Em relação aos aspectos ambientais, apesar de todas as vantagens do biodiesel em relação ao diesel do petróleo, verifica-se que as taxas de emissões de óxidos de nitrogênio ( $\text{NO}_x$ ) são maiores do que em combustíveis fósseis levando à necessidade de alterações em características dos motores a diesel, tais como tempo de injeção, tempo de espera de ignição, temperatura de combustão, etc. (Hoekman & Robbins, 2012).

Assim, é de suma importância a realização de estudos sobre biodiesel em diversas áreas e sob diferentes perspectivas quanto à produção, impacto ambiental e viabilidade econômica. Dessa forma o objetivo geral deste trabalho foi realizar o estudo da aplicação da lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY 552 para biocatálise de reações envolvendo óleos vegetais com vistas ao desenvolvimento de um sistema para obtenção de biodiesel. Na primeira etapa realizou-se estudo para obtenção de uma lipase microbiana a partir de resíduos agro-industriais para redução dos custos de obtenção do biocatalisador. A partir da lipase selecionada realizaram-se os estudos de purificação parcial e imobilização para obtenção de um preparado enzimático com condições adequadas para aplicação em sistema reacional de hidrólise e esterificação. Na segunda etapa, a enzima obtida teve sua capacidade hidrolítica e de esterificação avaliada em diferentes sistemas reacionais e diferentes óleos vegetais.

Ao término do trabalho foi possível obter um biocatalisador com elevada atividade enzimática, em torno de 500 U/g e eficiente para realização da hidrólise enzimática de diferentes óleos vegetais, atingindo cerca de 80% de hidrólise após 24 horas de reação, em condições tais que propiciem a utilização do hidrolisado como substrato para produção de biodiesel.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Produção de lipases

O interesse na produção e aplicação de lipases é bastante relatado na literatura, devido ao grande número de possibilidades de processos nos quais tais enzimas podem ser utilizadas. Atualmente há uma tendência de se pensar a produção de enzimas por via biotecnológica de forma integrada, buscando-se a otimização do processo de forma global, desde as primeiras etapas de produção (*upstream*), como obtenção do inóculo, preparação do meio e condições de cultivo até a fase de purificação enzimática (*downstream*) (Maldonado, 2006).

As lipases podem ser obtidas a partir de diferentes micro-organismos, tais como bactérias, leveduras e fungos. Borgström e Brockman (1984) relataram que fungos são ótimas fontes de obtenção de lipases, tendo em vista sua abundância na natureza, baixo custo e a produção de enzimas extracelulares, o que facilita a recuperação da enzima do meio de fermentação, seja ele líquido ou semi-sólido. Também diferentes fontes de nutrientes são relatadas na literatura para produção de lipases. A Tabela 1 elenca uma série de trabalhos a respeito da produção de lipases microbianas.

Tabela 1 – Referências sobre a produção de lipases obtidas a partir de diferentes micro-organismos

| <b>Referência</b>          | <b>Micro-organismo</b>       | <b>Condições experimentais/<br/>Substratos utilizados</b>  | <b>Resultados obtidos e conclusões</b>  |
|----------------------------|------------------------------|--|---|
| Maldonado et al., (2012A). | <i>Geotrichum</i> sp.        | Água de maceração de milho e óleo de soja no meio de cultivo.  | 35,0 U/mL após 32 horas de fermentação em frascos agitados. <sup>1</sup>                                  |
| Maldonado et al., (2012B)  | <i>Geotrichum candidum</i>   | Efeito da concentração de peptona, NaNO <sub>3</sub> , MgSO <sub>4</sub> , óleo de soja, temperatura e pH inicial para produção de lipase em frascos agitados e reator de mistura. | 16,0 U/mL após 48 horas com 3,0% de peptona, 0,5% de óleo de soja, pH inicial 7,0, 30° C e 250 rpm.       |
| Lui et al., (2011)         | <i>Burkholderia</i> sp. C20  | Resíduos alimentares, aeração entre 0,5 e 2,0vvm.  | Produtividade passou de 0,057 para 0,076 U/mL.h com o aumento da aeração. Atividade de 524 U/g peso seco. |
| Navarro et al., (2011)     |                              | Resíduos sólidos com alto teor de óleos provenientes de águas residuárias em condições termofílicas (45°C).  | 120.000 U/g extrato seco após a extração, após 20 dias de fermentação.                                    |
| Rigo et al. (2010)         | <i>Penicillium</i> P58 e P74 | Fermentação semi-sólida suplementada com uréia e óleo de soja.   | 140 U/g de extrato seco tanto em condições ácidas como alcalinas, após 48 horas.                          |

<sup>1</sup> Resultado referente ao capítulo III desta tese.

| Referência                     | Micro-organismo                         | Condições experimentais/<br>Substratos utilizados   | Resultados obtidos e conclusões  |
|--------------------------------|---|---|--|
| Yu et al., (2009)              | <i>Pseudomonas</i><br>Lip35             | Extrato de levedura, soja em pó, NaCl e Tween-80.   | 58,9 U/mL após 67 horas de fermentação.  |
| Goldback, (2008)               | Leveduras silvestres                    | Peptona e azeite de oliva no meio de cultivo.   | 3,0 U/mL após 48 horas de fermentação com leveduras silvestres.  |
| Mahanta, Gupta & Khare, (2008) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,<br>PseA | Fermentação semi-sólida com torta de semente de <i>Jatropha curcas</i> (pinhão-manso).      | 0,625 U/mg após 120 horas; com torta adicionada de peptona obteve-se 1,08 U/mg.                                |
| Teng & Xu, (2008)              | <i>Rhizopus chinesis</i>                | Produção de lipase com células imobilizadas.  | 13,9U/mL com $4,25 \cdot 10^8$ esporos/L, 2,37% m/v óleo de oliva, 18mL de meio de fermentação e 4,1% peptona. |
| Yan & Yan, (2008)              | <i>Geotrichum</i> sp.                   | Avaliou 13 variáveis na produção de lipase.   | 23,15 U/mL após 24 horas em frascos agitados.  |
| Loo et al., (2007)             | <i>Geotrichum candidum</i>              | Peptona e extrato de levedura.  | 22,59 U/mL após 54 horas.  |
| Maldonado, (2006)              | <i>Geotrichum candidum</i><br>NRRLY-552 | Água de maceração de milho e hidrolisado de levedura (fontes de nitrogênio) e óleo de soja. | 24 U/mL após 48 horas em fermentador <i>air-lift</i> .   |
| Burkert et al., (2005)         | <i>Geotrichum candidum</i><br>NRRLY-552 | Peptona como fonte de nitrogênio e óleo de soja.  | 20 U/mL, após 54 e 48 horas, em reator de mistura e em reator <i>air-lift</i> , respectivamente.               |

| Referência                             | Micro-organismo                                   | Condições experimentais/<br>Substratos utilizados  | Resultados obtidos e conclusões  |
|--|---|--|--|
| Yang et al., (2005)                    | <i>Rhizopus arrhizus</i><br>(micélio imobilizado) | Fermentação submersa com farinha de soja, óleo de amendoim, MgSO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> e (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .              | 315 U/mL após 96 horas a 26,5° C e 130 rpm com um aumento da produtividade em 5,6 vezes após seis fermentações em reator de bancada. |
| Burkert et al., (2004)                 | <i>Geotrichum</i> sp.                             | Água de maceração de milho como fonte de nitrogênio em frascos agitados.   | 18 U/mL após 48 horas.   |
| Gopinath et al., (2003)                | <i>Geotrichum candidum</i>                        | 1,25%C, 2,0% N, 1,0% Tween, 0,5mM sais, pH 7,0, 30°C.  | 89,6 U/mL após 6 dias de fermentação.  |
| Maldonado, Burkert e Rodrigues, (2001) | <i>Penicillium restrictum</i>                     | Peptona com fonte de nitrogênio, óleo de oliva, de soja e de milho como indutores.   | 22 U/mL após 48 horas utilizando óleo de milho como indutor.   |
| Kamimura et al., (1999)                | <i>Geotrichum</i> sp.                             | Água de maceração de milho como fonte de nitrogênio, em reator de bancada (400 rpm, 1,0 vvm, 30°C).  | 28 U/mL após 10 horas.   |
| Miranda et al., (1999)                 | <i>Penicillium citrinum</i>                       | Meio 1 – 1,0% óleo de oliva e 0,75% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; Meio 2 – 1,6% resíduo industrial e 0,75% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . | 2,63 e 5,79 U/mL, respectivamente, com pH inicial do meio de 5,5.  |

| <b>Referência</b>       | <b>Micro-organismo</b>                                       | <b>Condições experimentais/<br/>Substratos utilizados</b>            | <b>Resultados obtidos e conclusões</b>   |
|-------------------------|--|--|--|
| Cordova et al. (1998)   | <i>Rhizomucor pusillus</i> e <i>Rhizopus rhizopodiformis</i> | Fermentação semi-sólida com bagaço de cana e pasta de óleo de oliva. | 4,99 e 1,73 U/g (com bagaço de cana) e 20,24 e 79,60 U/g (com mistura bagaço e pasta de óleo). |
| Jacobsen et al., (1989) | <i>Geotrichum candidum</i><br>NRRLY-552                      | Meio de fermentação contendo peptona.                                | Aumento da atividade lipolítica após adição de azeite de oliva ou tween 80 ao meio.            |

Dos trabalhos publicados nota-se que uma grande variedade de micro-organismos e fontes de nutrientes são exploradas para a produção de lipases microbianas. As atividades enzimáticas obtidas variam bastante, mas em muitos casos não ultrapassam valores em torno de 20 U/mL quando se trata de fermentações submersas, algo comum para lipases, ao contrário de outras enzimas, como amilases ou proteases que em geral apresentam atividades enzimáticas bastante superiores. Fermentações em estado sólido, utilização de células imobilizadas e alterações genéticas têm sido alternativas utilizadas para aumentar a produção e a produtividade das lipases. Recentemente notam-se relatos mais freqüentes sobre aplicações e especificidade das lipases do que estudos relacionados à produção e otimização das condições de produção deste tipo de enzima.

## **2.2. Imobilização enzimática**

Uma forma de melhorar a eficiência em processos enzimáticos e possibilitar a utilização do biocatalisador por períodos prolongados, sem que haja perda da atividade enzimática é a imobilização. De acordo com Bickerstaff (1997) e Rosevear (1994), imobilização é a técnica que confina uma enzima com atividade catalítica de interesse em um sistema, prevenindo assim sua migração para o meio, ou fase móvel, onde se encontram

o substrato e produto. Este sistema, denominado bioreator, consiste da enzima física ou quimicamente associada a um suporte.

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização. A imobilização do biocatalisador em um suporte, sem prejuízo de sua atividade por um razoável período de tempo, pode assegurar sua reutilização ou mesmo possibilitar o uso em reatores contínuos levando à economia nos processos industriais (Santos, 2003).

A imobilização de lipases tem sido amplamente estudada nas últimas décadas e a aplicação de lipases imobilizadas nos últimos anos tem se mostrado uma boa alternativa para produção de biodiesel em reações de transesterificação. Na literatura são muitos os relatos da utilização das lipases imobilizadas, sejam elas comerciais ou não, na catálise enzimática para obtenção do biodiesel. A Tabela 2 elenca referências relacionadas com imobilização enzimática.

Tabela 2 – Referências sobre a imobilização enzimática

| <b>Referência</b> | <b>Técnica de imobilização</b>                                   | <b>Resultados e conclusões</b>   |
|-------------------|--|--|
| Xie & Wang (2012) | Imobilização de lipases em microesferas magnéticas de quitosana. | A imobilização foi eficiente e utilizou-se a enzima para produção de biodiesel por transesterificação de óleo de soja e metanol, com rendimento de 87% após 30 horas e com a enzima ativa após 4 ciclos de reação. |

| Referência                     | Técnica de imobilização   | Resultados e conclusões  |
|--------------------------------|---|--|
| Cabral, Fonseca e Dias, (2010) | Imobilização de lipase de <i>Candida rugosa</i> em espumas de poliuretano hidrofílico para produção de butirato de etila. | A atividade enzimática foi mantida em baixas concentrações de substrato (30 repetições), mas foi desativada em altas concentrações do etanol, devido ao acúmulo desse em alta concentração nas espumas.  |
| Li & Wu, (2009)                | Imobilização de lipase em poliacrilonitrila aplicada à hidrólise de óleo de soja  | A lipase de <i>Candida rugosa</i> foi imobilizada por <i>eletrospinning</i> e ativada por reação de amidação em nanofibras de poliacrilonitrila. Houve uma retenção de 87,5% da atividade com a imobilização e a enzima levou a uma hidrólise do óleo de soja de 72% após 10 minutos e 85% após 1,5 horas. A enzima manteve 65% da atividade após 20 ciclos. |
| Zeng et al., (2009)            | Imobilização de lipase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por adsorção física em hidrotalcita de Mg-Al.                   | A enzima imobilizada com temperatura e pH ótimos maiores e mais estável (menor energia de ativação e maior energia de desativação) que enzima livre. Manteve atividade por 10 ciclos na produção alcalina de biodiesel, com 81% de conversão.  |
| Liu & Chang, (2008)            | Imobilização da lipase de <i>Burkholderia</i> sp. em nitrato de celulose.   | Obteve-se uma retenção de 60% de atividade lipolítica em pH 9,0 e temperatura de 55°C.   |
| Shao et al., (2008)            | Imobilização da lipase de <i>Candida rugosa</i> em quitosana.   | Obteve-se uma conversão de 63% na reação de metanólise do óleo de canola.  |

| Referência                       | Técnica de imobilização   | Resultados e conclusões  |
|----------------------------------|---|--|
| Wei & Wu (2008)                  | Imobilização de lipase de <i>Burkholderia</i> sp. por adsorção simples em octil-sepharose CL-4B.  | A enzima imobilizada apresentou boa estabilidade em pH entre 5 e 8 e acima de 50°C e na presença de solvente orgânico, quando comparada a enzima livre.          |
| Shah, Sharma, Gupta (2004)       | Imobilização das lipases de <i>Chromobacterium viscosum</i> e de <i>Candida rugosa</i> em Celite-145  | A utilização da enzima imobilizada elevou o rendimento da produção de biodiesel de 62 para 71% comparado com a enzima livre para <i>Chromobacterium viscosum</i> |
| Soares et al., (2003)            | Imobilização em sílica gel da lipase de <i>Candida rugosa</i> – avaliação do efeito de polietilenoglicol (PEG e albumina bovina) na atividade lipolítica. | 59,6% de imobilização utilizando PEG-1.500, com um aumento de 2,7 vezes na meia vida da enzima.  |
| Castro, Silva e Silva (2000)     | Adsorção física em suporte inorgânico da lipase de <i>Candida rugosa</i> .  | 34% de retenção da atividade lipolítica em fosfato de zircônio.  |
| Xenakis e Stamarts (1999)        | Imobilização da lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> em microemulsão de gel (gelatina e ágar).  | O gel apresentou boa estabilidade e retenção da atividade lipolítica após reação de esterificação de ácido láurico com isoctano, incubado por 72 horas a 25°C.   |
| Reetz, Zonta e Simpelkamp (1996) | Aprisionamento em sílica gel hidrofóbica.   | Pode ser aplicado para vários tipos de lipases e aumentou o rendimento de reações de esterificação em até 88 vezes.  |

### 2.3. Produção de biodiesel

Transesterificação ou alcóolise é a reação que ocorre entre os triacilgliceróis presentes em gordura ou óleo com um álcool para formação de éster e glicerol. Esta reação é reversível e, deste modo, se faz necessário o uso de catalisadores e de excesso de álcool no meio reacional de modo a se obter alto rendimento e maior velocidade de reação (Ma & Hanna, 1999). A produção de biodiesel também pode ser dividida, com uma primeira etapa de hidrólise de óleos vegetais produzindo ácidos graxos livres seguida de esterificação do hidrolisado obtido com um álcool para a produção dos ésteres de ácidos graxos (biodiesel).

Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) é o álcool mais utilizado em processos de obtenção de biodiesel por apresentar baixo custo e vantagens químicas na reação. Ele é um álcool bastante polar e de cadeia carbônica curta, o que facilita o processo de transformação dos triacilgliceróis em metil ésteres de ácidos graxos. No Brasil, entretanto, há um interesse grande no desenvolvimento da produção de biodiesel a partir do etanol, devido à grande disponibilidade deste reagente, baixo custo e por ser obtido de uma fonte renovável (cana de açúcar).

Industrialmente os métodos mais utilizados são os que fazem uso de catalisadores básicos (hidróxidos ou metóxidos metálicos), que levam a altos rendimentos na conversão de triacilgliceróis em biodiesel. No entanto, processos enzimáticos têm despertado interesse nos últimos anos, pois apresentam uma série de vantagens, segundo relataram Fukuda, Kondo e Noda (2001). Segundo estes autores a utilização de lipases é vantajosa porque os tempos de reação são reduzidos, a recuperação do glicerol do meio reacional é mais fácil e eliminam-se as etapas de lavagem para remoção da alcalinidade residual do produto, bem como é evitada a formação de sabões devido à reação do catalisador alcalino com ácidos graxos livres presentes nas matérias-primas oleaginosas. Por outro lado, o custo de obtenção das lipases ainda é uma grande barreira à aplicação industrial deste tipo de biocatalisador. Na última década, um grande número de trabalhos a respeito da produção de biodiesel tem sido relatado na literatura. A Tabela 3 apresenta alguns destes trabalhos, que

apresentam uma grande variedade de catalisadores, micro-organismos, fontes de matérias-primas e processos que podem ser utilizados para a produção do biocombustível.

Tabela 3 – Referências sobre a produção de biodiesel por via enzimática

| <b>Referência</b>                            | <b>Processo avaliado</b>  | <b>Resultados e conclusões</b>   |
|--|---|--|
| Charpe e Rathod (2011)                       | Transesterificação de óleo de girassol utilizado em fritura.  | 64% de rendimento em 24 horas com lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> a 45°C, 5% m/m de enzima e razão molar metanol:óleo de 3:1.   |
| Yan et al., (2011)                           | Hidrólise de óleo de peixe para enriquecimento de ácidos poliinsaturados.   | Lipase imobilizada e sistema reacional com duas fases (aquosa e orgânica) aumentaram de 12 para 40% a taxa de hidrólise de óleo de peixe, com efeito positivo dos solventes de baixa polaridade e negativo com os de alta polaridade e muito hidrofóbicos.                           |
| Tongboriboon, Cheirsilp e H-Kittikun, (2010) | Produção de biodiesel com óleo de palma e etanol em sistema livre de solvente com diferentes lipases.                         | A produção de biodiesel foi mais eficiente com a mistura de duas lipases (lipase AK de <i>Pseudomonas fluorescens</i> e lipase AY de <i>Candida rugosa</i> ) com rendimento de 67%, com 2% m/m de água, 10% m/m de enzima e razão molar etanol: óleo de 3:1.                         |
| Yang et al., (2010)                          | Avaliação da atividade de hidrólise e de transesterificação da lipase de <i>Penicillium expansus</i> em diferentes solventes. | A hidrólise sobre pNPP foi 12 vezes maior em líquido iônico do que em solventes orgânicos. A transesterificação com óleo de milho e metanol atingiu rendimentos de 70% em líquido iônico, 19% em álcool terc-bufílico, 14% em sistema livre de solvente, 1% em hexano após 25 horas. |

| Referência                               | Processo avaliado  | Resultados e conclusões   |
|--|--|---|
| Al-Zuhair, Ramachandran e Hansan (2008). | Produção de biodiesel a partir do hidrolisado do óleo de palma com lipase livre de <i>Candida rugosa</i> .                                 | Rendimento superior a 90% utilizando 660 mol/m <sup>3</sup> de óleo de palma, 45°C, agitação de 800 a 1300 rpm e concentração enzimática entre 25 e 250 g/m <sup>3</sup> .  |
| Ting et al., (2008)                      | Produção de biodiesel com hidrolisado de óleo de soja do trabalho anterior (Ting et al., (2006) e metanol com catalisador ácido.           | Hidrólise de 88% do óleo de soja com enzima imobilizada após 5 horas de reação e obteve-se 99% de conversão de hidrolisado em biodiesel com razão molar 1:15 ácidos graxos livres/metanol, 2,5% de ácido sulfúrico, 50°C após 12 horas de reação. |
| Al-Zuhair, Ling & Jun (2007)             | Produção de biodiesel por óleo de palma e metanol com lipase de <i>Mucor mieher</i> .  | 1250 e 300 mol/m <sup>3</sup> foram as concentrações de óleo de palma e metanol em que ocorreu inibição pelo substrato.   |
| Hama et al., (2007)                      | Produção de biodiesel em reator de leito empacotado com células imobilizadas de <i>Rhizopus oryzae</i> a partir de óleo de soja e metanol. | 90% de rendimento com vazão de 25 L/h no primeiro ciclo e 80% de rendimento após dez ciclos de reação. O reator empacotado reduziu os danos às células imobilizadas e o excesso de tempo de contato com metanol.                                  |
| Royon et al., (2007)                     | Produção de biodiesel de óleo de algodão e metanol com lipase de <i>Candida antarctica</i> utilizando t-butanol como solvente.             | 97% de rendimento, após 24 horas, a 50°C, com 32,5% t-butanol, 13,5% metanol, 54% de óleo (m/m) e 0,017 g de enzima/g óleo. O mesmo resultado com reator de leito fixo na vazão de 9,6 mL.h <sup>-1</sup> .(g enzima) <sup>-1</sup> .             |

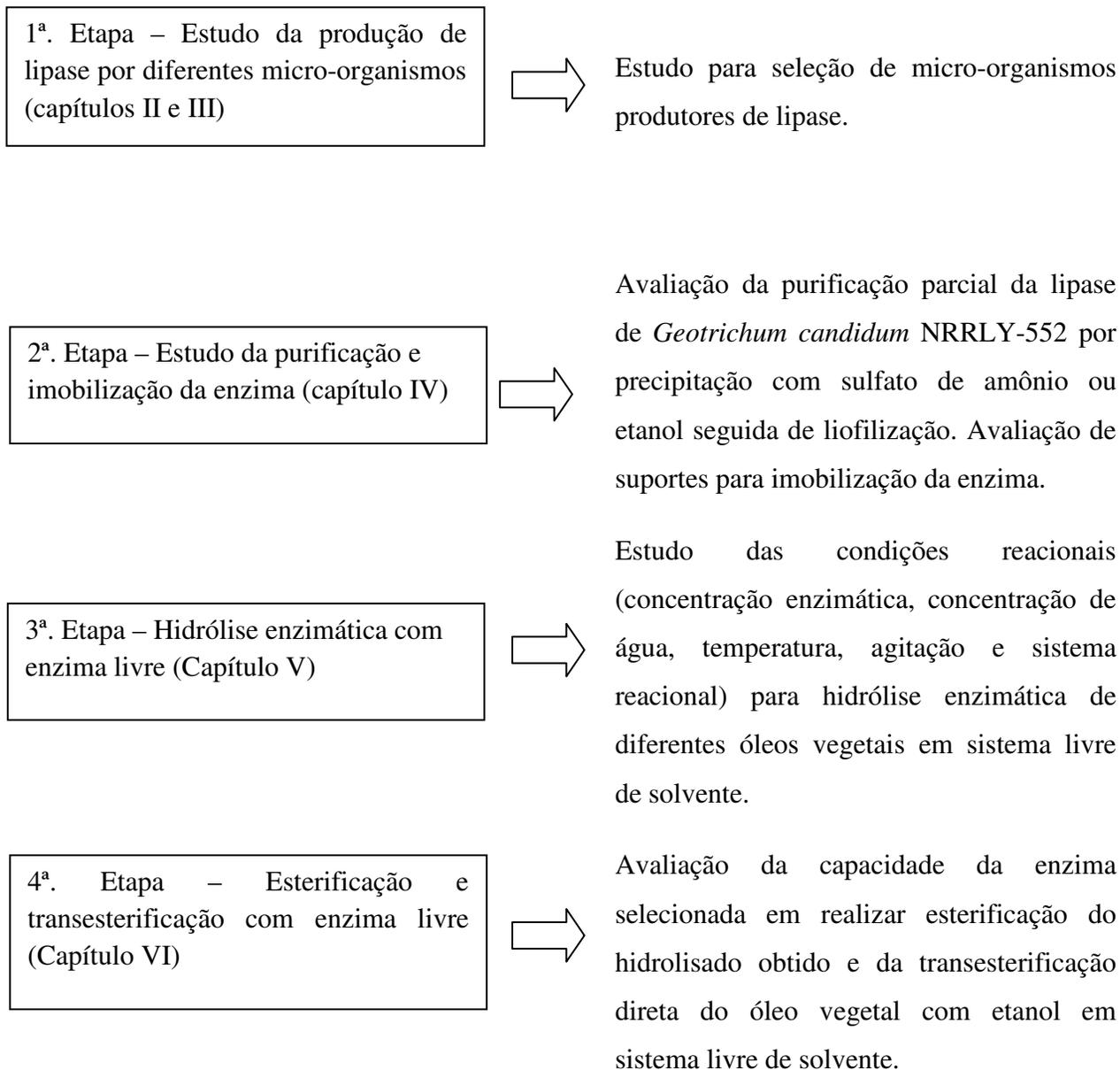
| <b>Referência</b>                       | <b>Processo avaliado</b>   | <b>Resultados e conclusões</b>   |
|---|--|--|
| Watanabe et al., (2007)                 | Hidrólise de óleo vegetal seguida de esterificação com metanol.  | 90% de hidrólise com 40% m/m de água e 47% de hidrólise na ausência de água, com 100 U/g óleo e 24 horas de reação (lipase de <i>Candida rugosa</i> ). 96% de esterificação, após 24 horas com 1% m/m de enzima (lipase de <i>Candida antarctica</i> ) e razão molar óleo hidrolisado: metanol de 1:5. |
| Al-Zuhair et al., (2006)                | Esterificação de ácido butírico com metanol com lipase de <i>Mucor mieher</i> , em sistema bifásico (n-hexano/água). | A concentração de água não inibiu a velocidade inicial da reação até a concentração de 25% v/v, no entanto as maiores conversões foram obtidas para baixas concentrações de água.  |
| Ting et al., (2006)                     | Hidrólise enzimática de óleo de soja por lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada.                                | 88% de conversão em ácidos graxos livres, com pH 8,0, 40°C, razão molar óleo/tampão 2:1 (m/m), após 5 horas.   |
| Al-Zuhair, Hansan e Ramachandran (2003) | Hidrólise de óleo de palma com lipase de <i>Candida rugosa</i> .   | Avaliou-se a concentração da enzima e agitação do sistema na interface água-óleo, obtendo-se um modelo para a hidrólise do óleo de palma. O aumento da concentração da enzima (na faixa de 25 a 250 g/cm <sup>3</sup> ) e da agitação (800 a 1300 rpm) aumentaram a produção de ácidos graxos livres.  |
| Vieira et al. (2002)                    | Produção de hexadecanoato de etila com ácido palmítico e etanol e lipases comerciais.                                | 50% de conversão utilizando 0,5 de razão molar ácido/álcool; 67°C; 4,5% m/m de lipase.   |

| <b>Referência</b>     | <b>Processo avaliado</b>   | <b>Resultados e conclusões</b>  |
|-----------------------|--|---|
| Kaieda et al., (1999) | Produção de biodiesel de óleo de soja e metanol por lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> . | Processo eficiente com água na faixa de 4 a 30% em massa e rendimentos entre 80 e 90% m/m de metil ésteres. |

Da análise das referências citadas pode-se perceber que a produção de biodiesel por via enzimática vem sendo explorada com diferentes tipos de óleos vegetais (soja, palma, algodão, pinhão-manso, etc.), mas no que diz respeito à fração alcoólica da reação observa-se que o metanol é o álcool mais utilizado. Os fatores de conversão obtidos são altos, mas em muitos artigos relata-se a utilização de enzimas imobilizadas comerciais, que apresentam alto grau de pureza, mas também, custo bastante elevado. Quanto ao processo de obtenção de biodiesel há uma predominância da transesterificação, mas há investigações também de sistemas reacionais de hidrólise seguido esterificação, que possibilitam a utilização de outras matérias-primas, como por exemplo, hidrolisados com alto teor de ácidos graxo; o controle da concentração de ácidos graxos no sistema reacional; avaliar as concentrações do reagente alcoólico e de água mais adequados ao processo; possibilidade de usar biocatalisadores mais específicos para cada etapa, etc.

### 3. FLUOXAGRAMA DAS ETAPAS DO TRABALHO

De acordo com os objetivos propostos e a avaliação das referências encontradas na literatura, o trabalho foi estruturado em uma sequência de etapas conforme mostrado no fluxograma a seguir.



#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Zuhair, S.; Hasan, M e Ramachandran, K.B. **Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase**, *Process Biochemistry*, v.38, p.1155–1163, 2003.
2. Al-Zuhair, S.; Jayaraman, K.V.; Krishnan, S.; Chan, W-H. **The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase**. *Biochemical Engineering Journal*, v.30, p.212-217, 2006.
3. Al-Zuhair, S.; Ling, F.W.; Jun, L.S. **Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase**, *Process Biochemistry*, v.42, p.951-960, 2007.
4. Al-Zuhair, S.; Ramachandran, K.B. e Hasan, M. **Effect of enzyme molecules; covering of oil-water interfacial area on the kinetic of oil hydrolysis**. *Chemical Engineering Journal*, v.139, n.3, p.540-548, 2008.
5. Borgström, B.; Brockman, H.L. **Lipases**. Elsevier Science Publishing Company, Netherlands, 1984.
6. Bickerstaff, G.F.. **Immobilization of enzymes and cells**, *Methods in Biotechnology 1*; Human Press, New Jersey; 367 pp.; 1997
7. Burkert, J.F.M., Maugeri, F., Rodrigues, M.I. **Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design**. *Bioresource Technology*, n.91, p.77-84, 2004.
8. Burkert, J.F.M.; Maldonado, R.R.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. **Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters**. *Journal Chemical Technology and Biotechnology.*, n.80, p.61-67. 2005.
9. Cabral, P.P.; Fonseca, M.M.R.; Dias,S.F. **Esterification activity and operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams in the**

- production of ethyl butyrate.** *Biochemical Engineering Journal*, v.48, n.2, p.246-252, 2010.
10. Castro, H.F.; Silva, M.L.C.P. and Silva, G.L.J.P. **Evaluation of inorganic matrixes as supports for immobilization of microbial lipase.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.17, n° 04-07, p. 849-857, 2000.
  11. Charpe, T.; Rathod, V.K. **Biodiesel production using waste frying oil.** *Waste Management*, v.31, n.1, p. 85-90, 2011.
  12. Cordova, J.; Nemmaqui, M.; Ismaili - Alaoui, M.; Morin, A.; Roussos, S.; Raimbault, M.; Benjlali, 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.
  13. Demirbas, A. **Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods.** *Progress in Energy and Combustion Science*, v.31, n.5, p.466-487, 2005.
  14. Demirbas, A. **Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats.** *Energy Conversion and Management*, v.49, n.1, p. 125-130, 2008.
  15. Dwivedi, G.; Jain, S.; Sharma, M.P. **Impact analysis of biodiesel on engine performance.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.15, n.9, p.4633-4641, 2011.
  16. Fukuda, H.; Kondo, A.; Noda, H. **Biodiesel fuel production by transesterification of oils.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol.92, n.5, pg.405-416. 2001.
  17. Gog, A.; Roman, M.; Tosa, M.; Paizs, C.; Irimie, F.D. **Biodiesel production using enzymatic transesterification – current state and perspectives.** *Renewable Energy*, v.39, n.1, p.10-16, 2012.

18. Goldeback, R. **Triagem, produção e avaliação da atividade da enzima lipase a partir de leveduras silvestres.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 2008.
19. Gopinath, S.C.B., Hilda, A, Priya, T.L., Annadurai, G., Anbu, P. **Purification of lipase from *Geotrichum candidum*: conditions optimized for enzyme production using Box-Behnken design.** *World Journal Microbiology Biotechnology*, v.19, p. 681-689, 2003.
20. Hama, S.; Yamaji, H.; Fukumizu, T.; Numata, T.; Tamalampudi, S.; Kondo, A.; Noda, H. and Fukuda, H. **Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles.** *Biochemical Engineering Journal*. v.34, nº 3, p. 273-278, 2007.
21. Hatzinikolaou, D.G.; Macris, J.B.; Christakopoulos, P.; Kekos, D.; Kolisis, F.N.; Fountoukidis. **Production and parcial characterization of lipase from *Aspergillus niger*.** *Biotechnology Letters*, v.18, n.5, p.547-552. 1996.
22. Hoekman, S.K.; Robbins, C. **Review of the effects of biodiesel on NOx emissions.** *Fuel Processing Technology*, v.96, p.237-249, 2012.
23. Jacobsen, T.; Jensen, B.; Olsen, J.; Allermann, K. **Extracellular and cell-bound lipase activity in relation to growth of *Geotrichum candidum*.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.32, n.3, p.256-261. 1989.
24. Kaieda, M.; Samukawa, T.; Matsumoto, T.; Ban, K.; Kondo, A.; Shimada, Y.; Noda, H.; Nomoto, F.; Ohtsuka, K.; Izumoto, E. and Fukuda, H. **Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.88, nº. 6, p.627-631, 1999.

25. Kamimura, E.S., Mendieta, O., Sato, H.H., Pastore, G., Maugeri, F. **Production of lipase from *Geotrichum sp.* and adsorption studies on affinity resin.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.16, n.2, p.103-112. 1999.
26. Li, S-F.; Wu, W-T. **Lipase-immobilized electrospun PAN nanofibrous membranes for soybean oil hydrolysis.** *Biochemical Engineering Journal*, v.45, n.1, p. 48-53, 2009.
27. Liu, C-H.; Chang, J-S. **Lypolytic activity of suspended and membrane immobilized lipase originating from indigenous *Burkholderia sp.* C20.** *Bioresource Technology*, v.99, p.1616-1622, 2008.
28. Lui, C-H.; Chen, C-Y; Wang, Y-W.; Chang, J-S. **Fermentation strategies for the production of lipase by an indigenous isolate *Burkholderia sp.* C20.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 58-59, p.96-102, 2011.
29. Loo, J.L., Lai, O.M., Long, K., Ghazali, H.M. **Fatty acid preference of mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Geotrichum candidum.*** *World Journal Microbiology Biotechnology*, v.23, p.1771-1778, 2007.
30. Ma, F. and Hanna, M.A. **Biodiesel production: a review.** *Bioresource Technology*, v.70, p.1-15, 1999.
31. Manhanta, N.; Gupta, A.; Khare, S.K. **Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate.** *Bioresource Technology*, v.99, p.1729-1735, 2008.
32. Maldonado, R.R.; Panciera, A.L.; Macedo, G.A.; Mazutti, M.A. Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. **Improvement of lipase production from *Geotrichum sp.* in shaken flasks.** *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, doi: 10.2298/CICEQ 120124022M, 2012A.
33. Maldonado, R.R.; Burkert, J.F.M.; Mazutti, M.A.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. **Evaluation of lipase production by *Geotrichum candidum* in shaken flasks and**

- bench-scale stirred bioreactor using different impellers.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.1, n.2, p.147-151, 2012B.
34. Maldonado, R.R. **Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 2006.
35. Maldonado, R.R.; Burkert, J.F.M.; Rodrigues, M.I. **Produção de Lipase por *Penicillium restrictum*.** IX Congresso Interno de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2001.
36. Miranda, O.A.; Salgueiro, A.A.; Pimentel, M.C.B.; Lima Filho, J.L.; Melo, E.H.M.; Duran, N. **Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue.** *Bioresource Technology*, v.69, p.145-147, 1999.
37. Navarro, A.S.; Gea, T.; Barrena, R.; Sánchez, A. **Production of lipases by solid state fermentation using vegetable oil-refining wastes.** *Bioresource Technology*, v.102, n.21, p.10080-10084, 2011.
38. Reetz, M.T.; Zonta, A. and Simpelkamp. **Efficient Immobilization of Lipases by Entrapment in Hydrophobic Sol-Gel Materials.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, p.527-534, 1996.
39. Rigo, E.; Ninow, J.L.; Luccio, M.; Oliveira, J.V.; Polloni, A.E.; Remonato, D; Arbter, F.; Vardanega, R; Oliveira, D.; Treichel, H. **Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements.** *Food Science and Technology*, v.43, n.7, p.1132-1137, 2010.
40. Rosevear, A. **Immobilized Biocatalysts – a critical review.** *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, v. 34B, p. 127-150, 1994.
41. Royon, D.; Daz, M.; Ellenrieder, G and Locatelli, S. **Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as solvent.** *Bioresource Technology*, v.98, p. 648-653, 2007.

42. Santori, G.; Nicola, G.; Moglie, M.; Polonara, F. **A review analyzing the industrial biodiesel production practice starting from vegetable oil refining.** *Applied Energy*, v.92, p.109-132, 2012.
43. Santos, R. **Imobilização de lipase em gel de pectina.** Tese de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina. 2003.
44. Shah, S.; Sharma, S. and Gupta, M.N. **Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of Jatropha Oil.** *Energy & Fuels*, v.18, p. 154-159, 2004.
45. Shao, P.; Meng, X; He, J. e Sun, P. **Analysis of immobilized *Candida rugosa* lipase catalyzed preparation of biodiesel from rapeseed soapstock.** *Food and Bioproducts Processing*. v.86, n.4, p.283-289, 2008
46. Soares, C.M.F; Santana, M.H.A.; Zanin, G.M.; Castro, H.F. **Efeito do polietileno glicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico.** *Química Nova*, v. 26, n.6, p. 832-838, 2003.
47. Teng, Y., Xu, Y. **Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method.** *Bioresource Technology*, v.99, n.9, p.3900-3907, 2008.
48. Ting, W.J.; Tung, K.Y.; Giridhar, R. e Wu, W.T. **Application of Binary Immobilized *Candida rugosa* Lipase for Hydrolysis of Soybean Oil.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.42, n.1-2, 2, p. 32-38, 2006.
49. Ting, W.J.; Huang, C.M.; Giridhar, N. e Wu, W.T.. **An enzymatic/acid-catalyzed hybrid process for biodiesel production from soybean oil.** *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, v.39, n.3, p.203-210, 2008.
50. Tongboriboon, K.; Cheirsilp, B.; H-Kittikun, A. **Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 67, n.1-2, p.52-59, 2010.

51. Vieira, A.P.A.; Silva, M.A.P.; Langone, M.A.P. **Biodiesel production via esterification reactions catalyzed by lipase.** 2<sup>nd</sup> Mercosul Congress on Chemical Engineering. 4<sup>th</sup> Mercosul Congress on Process Systems Engineering. 2002.
52. Watanabe, Y.; Nagao, T.; Nishida, Y.; Takagi, Y.; Shimada, Y. **Enzymatic Production of Fatty Acid Methyl Esters by Hydrolysis of Acid Oil Followed by Esterification.** *Journal American of Oil Chemical Society*, v.84, p.1015-1021, 2007.
53. Wei, H-N.; Wu, B. **Screening and Immobilization *Burkholderia* sp. GXU56 lipase for enantioselective resolution of (R,S)-methyl mandelate.** *Applied Biochemical and Biotechnology*, v.149, p.79-88, 2008.
54. Xenakis, A; Stamatis, H. **Lipase immobilization on microemulsion-based polymer gel.** *Progress Colloid Polymery Science.*, v.112, p.132-135, 1999.
55. Xie, W.; Wang, J. **Immobilized lipase on magnetic chitosan microspheres for transesterification of soybean oil.** *Biomass and Bioenergy*, v.36, p.373-380, 2012.
56. Yan, J.; Liu, S.; Hu, J.; Gui, X.; Wang, G.; Yan, Y. **Enzymatic enrichment of polyunsaturated fatty acids using novel lipase preparations modified by combination of immobilization and fish oil treatment.** *Bioresource Technology*, v.102, n.14, p.7154-7158, 2011.
57. Yan, J-Y., Yan, Y-J. **Optimization for producing cell-bound lipase from *Geotrichum* sp. and synthesis of methyl oleate in microaqueous solvent.** *Applied Biochemical and Biotechnology*, v.78, p. 431-439, 2008.
58. Yang, X.; Wang, B.; Cui, F.; Tan, T. **Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*.** *Process Biochemistry*, v.40, n.6, p.2095-2103, 2005.
59. Yang, Z.; Zhang, K-P; Huang, Y.; Wang, Z. **Both hydrolytic and transesterification activities of *Penicillium expansum* lipase are significantly enhanced in ion liquid**

[BMIm][PF<sub>6</sub>]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.63, n.1-2, p.23-30, 2010.

60. Yu, H-W.; Ning, J.H.; Qie, X-S.; Jia, Y-M. **Fermentation Performance and Characterization of Cold-Adapted Lipase Produced with *Pseudomonas* Lip 35.** *Agricultural Sciences in China*, v.8, n.8, p.956-962, 2009.
61. Zeng, H-Y.; Liao, K.; Deng, X.; Jiang, H.; Zhang, F. **Characterization of the lipase immobilized on Mg-Al hydrotalcite for biodiesel.** *Process Biochemistry*, v.44, n.8, p.791-798, 2009.

**CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE MICRO-ORGANISMOS**  
**PRODUTORES DE LIPASE**

**Lipase production from different microorganisms using agro  
industrial by-products**

Rafael Resende Maldonado<sup>2a</sup>, Felipe Masiero Fogaça<sup>a</sup>, Gabriela Giolo Ramos<sup>a</sup>, Gabriela  
Alves Macedo<sup>b</sup>, Marcio A. Mazutti<sup>c</sup> and Maria Isabel Rodrigues<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Food Engineering, University of Campinas, P.O. Box 6121, Campinas -  
SP, 13083-862 – Brazil

<sup>b</sup> Department of Food Science, University of Campinas, P.O. Box 6121, Campinas - SP,  
13083-862 – Brazil

<sup>c</sup> Department of Chemical Engineering - Federal University of Santa Maria, Av. Roraima,  
1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

**Artigo elaborado para submissão para revista**

***Food and Bioprocess Technology***

---

<sup>2</sup> Rafael R. Maldonado, Department of Food Engineering, University of Campinas, P.O. Box 6121, Campinas - SP, 13083-862 – Brazil. Fax: +551935214027. E-mail: ratafta@yahoo.com.br

## ABSTRACT

This work is focused on the study of different microorganisms to obtain a high level of lipase to apply in biocatalysis of reaction with vegetable oils. It was selected 6 different microorganisms: *Geotrichum candidum* NRRLY-552, *Geotrichum* sp., *Fusarium oxysporum* and three wild yeasts from rainforest in Brazil. Fermentation carried out to obtain lipase using agro industrial by-products like corn steep liquor and protein hydrolysed in shaken flasks under different conditions according to each microorganism. The best results obtained were 17 U/mL from *Geotrichum candidum* NRRLY-552 using 8.0% of corn steep liquor and 0.6% of soybean oil after 48 hours; 11 U/mL from *Geotrichum* sp. using 12% of corn steep liquor and 0.6% of soybean oil after 16 hours; 3.22 U/mL from AAV1 wild yeast using 12% of corn steep liquor and 1.5% of soybean oil after 48 hours and 3.54 U/mL from *Fusarium oxysporum* using 8% of corn steep liquor and 1.0% of soybean oil. This work showed that imperfect fungi *Geotrichum* have better potential to produce lipase compared to other microorganisms evaluated. However, lipase from *Fusarium oxysporum* showed a good stability in high pH which is very interesting to new applications of lipase in alkaline conditions.

*Key words: lipase; corn steep liquor; soybean oil*

## 1. INTRODUÇÃO

Os fungos são os micro-organismos preferidos como produtores industriais de lipases, porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita a extração do meio fermentado, além de serem mais estáveis e com propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes (Burkert 2003; Ciafardini, Zullo & Iride 2006). Apesar de um grande número de estudos se preocuparem com a aplicação de lipases, alguns grupos de pesquisa tem se dedicado ao isolamento e otimização da produção de lipases de diferentes tipos de micro-organismos (Pastore et al. 2003).

A produção de lipases fúngicas vem sendo amplamente estudadas, como por exemplo as obtidas de fungos do gênero *Geotrichum*, com otimização de meios de cultura para *Geotrichum* sp. em frascos agitados utilizando resíduo industrial (Medeiros 1999; Maldonado et al. 2012A; Yan & Yan 2008) e em reator de mistura (Kamimura 1999); otimização de meios de cultura para *Geotrichum candidum* NRRLY-552 em frascos agitados com meio sintético (Loo et al. 2007; Maldonado et al. 2012B), em reator de mistura e reator *air-lift* (Burkert et al. 2005); utilizando resíduos industriais em frascos agitados e em reator de mistura e *air-lift* (Maldonado, 2006). A produção de lipases por outros fungos também foi investigada, tais como *Penicilium citrinum* (Miranda et al. 1999), *Penicillium restrictum* (Maldonado et al. 2001), *Fusarium oxysporum* (Prazeres 2006; Pio & Macedo 2008).

Além de fungos, as leveduras também são bastante estudadas na produção de diferentes tipos de enzimas. Leveduras são fungos de natureza unicelular e podem ser encontradas em diferentes tipos de ambientes. Considerando um país como o Brasil com uma grande biodiversidade é de se esperar que um grande número de espécies microbianas presentes em nosso país não tenham sido descritas ainda. Pensando em explorar este potencial realizou um *screening* de diferentes tipos de leveduras a partir de amostras coletadas em diferentes partes do Brasil para avaliar a capacidade destas leveduras em produzir enzimas (Hernalsteens 2006). Em outro trabalho deu-se continuidade a estes

estudos no que diz respeito à avaliação do potencial de produção de lipases de 44 leveduras selecionadas do estudo anterior (Goldeback 2008).

A produção de lipases foi explorada a partir dos fungos *Geotrichum candidum* NRRLY-552, *Geotrichum* sp., *Fusarium oxysporum* e por leveduras silvestres. O segundo e terceiro fungos citados foram isolados pelo Laboratório de Bioquímica de Alimentos (DCA/FEA/Unicamp) e as leveduras, pelo Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (DEA/FEA/Unicamp).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Avaliação da produção de lipase por fungos do gênero *Geotrichum***

A produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552 foi objeto de estudo anterior, em que foram obtidas condições otimizadas para produção da enzima utilizando este micro-organismo. Realizou-se então um experimento utilizando a condição otimizada: 8,0% de água de maceração de milho; 0,6% de óleo de soja; pH inicial 7,0; temperatura de 30°C; agitação de 250 rpm (Maldonado, 2006). O inóculo foi realizado utilizando meio sintético com tempo de incubação de 15 horas (Burkert, 2003), para verificar se a cepa disponível mantinha as mesmas características originais.

Por outro lado, a produção de lipase por *Geotrichum* sp. já havia sido objeto de estudo anterior obtendo-se meio otimizado para produção da lipase utilizando água de maceração de milho (Burkert et al 2004). Um teste preliminar foi realizado utilizando meio de fermentação com condições similares as descritas no trabalho citado acima, alterando-se a forma de obtenção do inóculo. O micro-organismo foi cultivado em placa de Petri contendo meio Yeast Malt por 48 horas a 30°C, após este período 2 áreas circulares de 1,0cm de diâmetro foram transferidos para frasco contendo 100 mL de meio de inóculo (5% de peptona, 0,1% de nitrato de sódio, 0,1% de sulfato de magnésio e 1,0% de óleo de soja) e incubados por 15 horas. Alíquotas de 10 mL do meio de inóculo foram transferidas para frascos contendo meio de fermentação com 12% de água de maceração de milho, 0,6% de óleo de soja e pH inicial igual a 6,0 (Maldonado 2006). A fermentação foi realizada por

16 horas a 30°C e 150 rpm e a atividade lipolítica e o pH foram avaliados ao longo do tempo de fermentação.

## **2.2. Avaliação da produção de lipase por leveduras silvestres**

Três leveduras isoladas no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB) foram selecionadas em um trabalho anterior como leveduras com potencial para produção de lipases (Goldeback 2008). Primeiro avaliou-se a capacidade destas três leveduras em produzir lipase a partir de diferentes fontes de nitrogênio. As leveduras utilizadas foram codificadas por AY3 (isolada de queijo), AAV1 e AC02 (isoladas da Mata Atlântica). As fermentações foram realizadas com três diferentes meios de cultivo:

- Meio 1 – 5,0% de peptona; 0,1% de extrato de levedura; 0,1% de sulfato de magnésio; 0,1% de nitrato de sódio e 1,0% de óleo de soja.
- Meio 2 – 12% de hidrolisado de levedura (Prodex-lac<sup>®</sup>) e 1,0% de óleo de soja;
- Meio 3 – 15% de água de maceração de milho e 1,0% de óleo de soja.

Os ensaios foram realizados na temperatura de 30°C, agitação de 150 rpm, pH inicial igual a 6,0. O inóculo foi obtido a partir das cepas das leveduras incubadas em tubo de ensaio contendo 10 mL do respectivo meio de cultivo, em cada caso, incubados nas mesmas condições da fermentação, por período de 24 horas. Após este período, o conteúdo de cada tubo foi vertido nos frascos contendo meio de cultivo e incubados por 48 horas. A atividade lipolítica e o pH foram as respostas avaliadas.

Após a realização dos testes preliminares a levedura AAV1 (isolada da Mata Atlântica) foi selecionada para a continuação dos estudos. Para tal, realizou-se um delineamento experimental do tipo Placket-Burman com 16 ensaios + 3 pontos centrais para avaliar o efeito de 10 variáveis sobre a produção de lipase. As variáveis estudadas, visando um incremento na produção de enzima, foram: concentração de sacarose, de extrato de levedura, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, KCl e MgSO<sub>4</sub> no meio de inóculo, tempo de inóculo, pH do meio de fermentação, concentração de óleo de soja e a relação entre concentração de

hidrolisado de levedura/água de maceração de milho no meio de fermentação. Os níveis avaliados estão apresentados na Tabela 1, sendo a atividade lipolítica e o pH as respostas analisadas ao longo do tempo de fermentação.

Tabela 1 – Níveis das variáveis estudadas para produção de lipase pela levedura AAV1

| Variável                            | -1   | 0   | +1   |
|-------------------------------------|------|-----|------|
| Sacarose (%)                        | 10   | 20  | 30   |
| Extrato de levedura (%)             | 2,0  | 5,0 | 8,0  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (%) | 0    | 2,0 | 4,0  |
| NH <sub>4</sub> Cl (%)              | 0    | 1,0 | 2,0  |
| KCl (%)                             | 0    | 1,0 | 2,0  |
| MgSO <sub>4</sub> (%)               | 0    | 0,5 | 1,0  |
| Tempo de inóculo (h)                | 12   | 18  | 24   |
| pH inicial                          | 5,0  | 6,0 | 7,0  |
| Óleo de soja (%)                    | 0,5  | 1,0 | 1,5  |
| Hidrolisado protéico/AMM (%/%)      | 12/0 | 6/6 | 0/12 |

### 2.3. Avaliação da produção de lipase por *Fusarium oxysporum*

Em um primeiro ensaio para produção de lipase por *Fusarium oxysporum* foram utilizados os seguintes meios de fermentação:

- Meio 1 – 0,06% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,02% de MgSO<sub>4</sub>; 0,02% de KCl; 0,01% de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,0% de óleo de soja (Pio & Macedo, 2008);
- Meio 2 – 5,0% de peptona; 0,1% de extrato de levedura; 0,1% de MgSO<sub>4</sub>; 0,1% de NaNO<sub>3</sub>, 1,0% de óleo de soja (Goldeback, 2008)
- Meio 3 – 12% de hidrolisado protéico; 1,0% de óleo de soja.
- Meio 4 – 15% de água de maceração de milho; 1,0% de óleo de soja.

Todos os meios de fermentação tiveram pH inicial ajustado para 7,2 e as fermentações foram realizadas a 30°C e 150 rpm, por 72 horas. Para obtenção do inóculo, o micro-organismo foi cultivado por 72 horas a 30°C em tubo de ensaio com meio PDA (Potato Dextrose Agar). Após este período, os esporos do micro-organismo foram ressuspensos com 5 mL de água destilada e transferidos para os frascos contendo meios de fermentação.

A partir dos resultados obtidos no primeiro teste, realizou-se um segundo teste preliminar para avaliar dois meios de fermentação:

- Meio 1 - 5,0% de peptona; 0,1% de MgSO<sub>4</sub>; 0,1% de NaNO<sub>3</sub>, 1,0% de óleo de soja;
- Meio 2 – 8% de água de maceração de milho; 1,0% de óleo de soja.

Neste teste, o inóculo foi obtido segundo metodologia otimizada (Burket, 2003), sendo que o meio de inóculo apresentou a mesma composição do meio de fermentação. O pH do meio de fermentação foi alterado para 6,0 e a atividade lipolítica foi avaliada nos tempos de 24, 48, 72 e 170 horas por análise titulométrica (Kamimura et al. 1999).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Avaliação da produção de lipase por fungos do gênero *Geotrichum***

Os resultados obtidos no experimento com meio otimizado para produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552 estão apresentados na Figura 1.

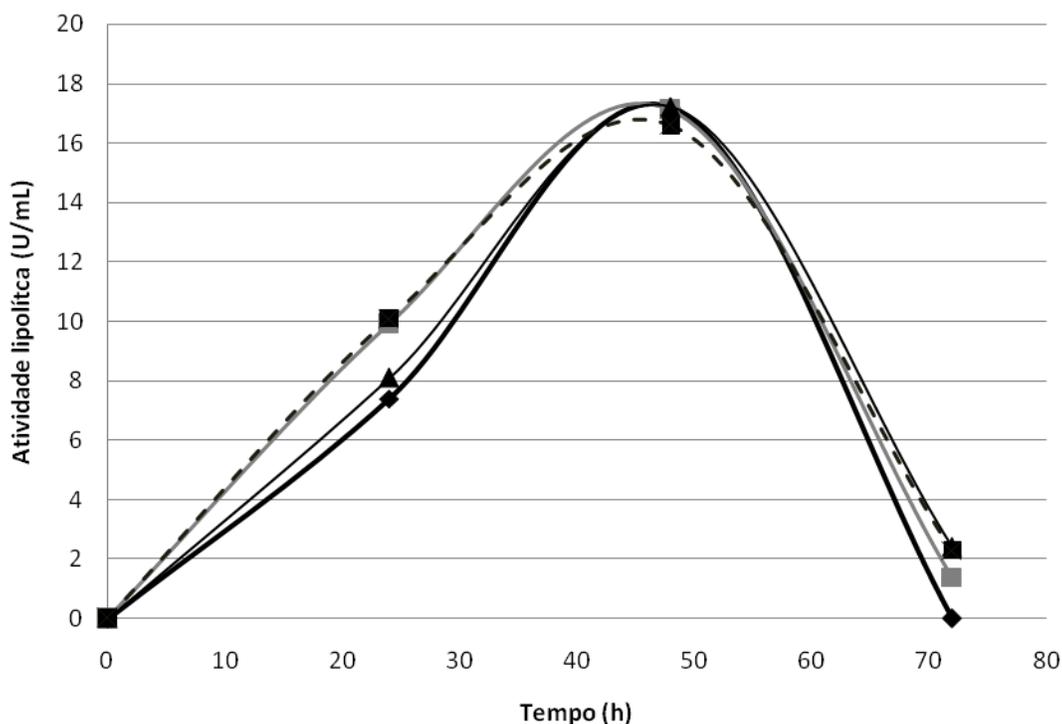


Figura 1 - Produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552 com água de maceração de milho (8%), óleo de soja (0,6%), pH inicial 7,0, 30°C e 250 rpm.

Pela Figura 1 é possível perceber que todos os ensaios realizados apresentaram atividade lipolítica bastante próxima, levando a um baixo desvio padrão, uma vez que todos os ensaios foram feitos na mesma condição. A máxima atividade lipolítica após 48 horas de fermentação foi de  $(17,0 \pm 0,3)$  U/mL. No trabalho anterior observou-se máxima produção de lipase pelo *Geotrichum candidum*, nas mesmas condições, entre 16 e 24 U/mL após 48 horas de fermentação (Maldonado 2006). Os resultados apresentados na Figura 1 demonstram que a cepa utilizada e as matérias primas estão adequadas para a produção de lipase para esse micro-organismo.

O resultado obtido encontra-se no mesmo nível de atividade enzimática do obtido em trabalho anterior, utilizando meio sintético, que foi de 20 U/mL (Maldonado et al. 2012B). Apesar da mesma atividade lipolítica, o custo de produção da lipase utilizando água de maceração de milho é 99% menor em relação ao meio sintético utilizando peptona.

Em termos de produtividade, o experimento apresentado mostrou um valor médio de 354U/L.h no tempo de 48 horas de fermentação, bem superior à produtividade de 123,5U/L.h encontrada na produção de lipase por *Candida cylindracea* NRRLY-17506 (Brozzoli et al. 2009).

Para a produção de lipase com o micro-organismo *Geotrichum* sp., os resultados estão na Figura 2.

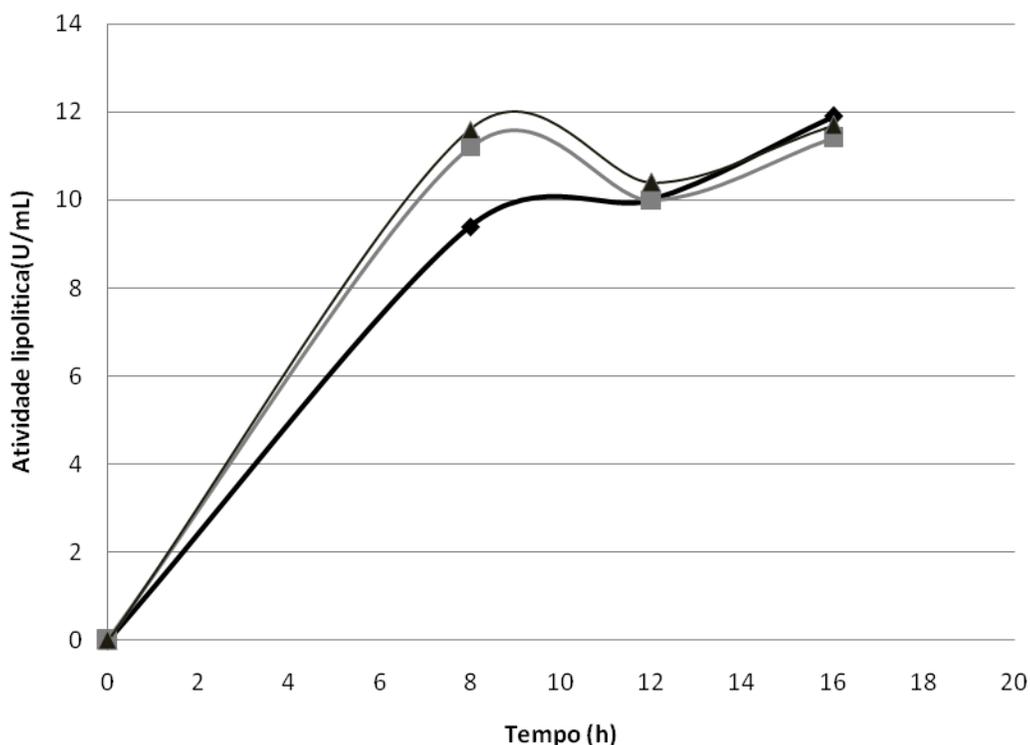


Figura 2. Produção de lipase por *Geotrichum* sp. com água de maceração de milho (12%), óleo de soja (0,6%), pH inicial 6,0, 30°C e 150 rpm.

A partir da Figura 2 é possível verificar que a atividade lipolítica atingiu cerca de 11 U/mL após 8 horas de fermentação. Este resultado é inferior ao que foi obtido anteriormente de cerca de 18 U/mL após 48 horas (Burkert et al. 2004). Apesar do resultado menor em termos de atividade lipolítica, a produtividade foi maior, pois o tempo de fermentação para obtenção da atividade lipolítica foi menor. Neste trabalho obteve-se

uma produtividade de 1,375 U/mL.h enquanto no trabalho anterior obteve-se 0,375 U/mL.h. Um aumento no tempo de fermentação para além de 16 horas pode levar a um aumento na produção da enzima, uma vez que de acordo com a Figura 2 há um incremento na produção de lipase entre 12 e 16 horas, indicando a capacidade do micro-organismo de continuar produzindo a enzima nas condições utilizadas. A partir destes resultados foram realizados delineamentos experimentais para se alcançar uma melhor condição para produção de lipase por *Geotrichum* sp. avaliando tanto as condições do meio de fermentação anteriores (Burkert et al. 2004), bem como as condições de inóculo. Os resultados obtidos constam de outro trabalho (Maldonado et al. 2012 A).

### 3.2. Avaliação da produção de lipase por leveduras silvestres

Os resultados relativos aos ensaios preliminares estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Atividade lipolítica e pH final para produção de lipase por leveduras silvestres após 24 horas de fermentação

| Ensaio | Levedura | Meio de fermentação* | Atividade (U/mL) | pH   |
|--------|----------|----------------------|------------------|------|
| 1      |          | Meio 1               | 1,7 ± 0,6        | 7,77 |
| 2      | AY3      | Meio 2               | 1,0 ± 0,2        | 7,14 |
| 3      |          | Meio 3               | 1,7 ± 0,3        | 6,50 |
| 4      |          | Meio 1               | 3,5 ± 0,1        | 7,35 |
| 5      | AAV1     | Meio 2               | 3,6 ± 1,3        | 7,08 |
| 6      |          | Meio 3               | 3,0 ± 0,5        | 6,34 |
| 7      |          | Meio 1               | 1,0 ± 0,6        | 7,84 |
| 8      | AC02     | Meio 2               | 1,8 ± 0,9        | 7,27 |
| 9      |          | Meio 3               | 1,6 ± 0,2        | 6,09 |

\* Fonte de nitrogênio utilizada: Meio 1 = peptona (5%); Meio 2 = hidrolisado de levedura (12%); Meio 3 = água de maceração de milho (15%).

Analisando-se as respostas apresentadas na Tabela 2, verifica-se que a produção de lipase pela levedura AAV1 foi duas a três vezes superior às demais leveduras para as diferentes fontes de nitrogênio utilizadas. (Goldeback 2008) já havia detectado que dentre 44 leveduras silvestres pré-selecionadas, as três leveduras acima citadas eram as maiores produtoras de lipase quando utilizada peptona como fonte de nitrogênio. Os resultados acima mostram que tais leveduras também são capazes de utilizar resíduos agro-industriais como fonte de nitrogênio obtendo-se níveis de atividade lipolítica compatíveis com os resultados obtidos com peptona e extrato de levedura.

Apesar da capacidade das leveduras citadas acima produzirem lipase, as atividades lipolíticas foram muito baixas para a aplicação pretendida (hidrólise e esterificação de óleos vegetais). Desta forma, para continuidade do estudo optou-se por utilizar apenas a levedura AAV1, que apresentou melhores resultados.

Dez variáveis relativas ao meio de inóculo e ao meio de fermentação foram avaliadas em um delineamento experimental tipo Plackett Burman, cujos valores utilizados e respostas obtidas, atividade lipolítica e pH em função do tempo de fermentação, estão contidos na Tabela 3.

Tabela 3 – Atividade lipolítica e pH final para produção de lipase pela levedura silvestre AAV1 em frascos agitados a 30°C e 150 rpm

| Ensaio | Sacarose (%) | Ext.de levedura (%) | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (%) | NH <sub>4</sub> Cl (%) | KCl (%) | MgSO <sub>4</sub> (%) | Tempo de inóculo (h) | pH    | Óleo de soja (%) | Hidrolisado /AMM (%/%) | Lipase (U/mL) |      | pH   |      |
|--------|--------------|---------------------|-------------------------------------|------------------------|---------|-----------------------|----------------------|-------|------------------|------------------------|---------------|------|------|------|
|        |              |                     |                                     |                        |         |                       |                      |       |                  |                        | 24h           | 48h  | 24h  | 48h  |
| 1      | 30(1)        | 2,0(-1)             | 0(-1)                               | 0(-1)                  | 4(1)    | 0(-1)                 | 12(-1)               | 7(1)  | 1,5(1)           | 12/0(-1)               | 0,61          | 0,18 | 6,74 | 6,90 |
| 2      | 30(1)        | 8,0(1)              | 0(-1)                               | 0(-1)                  | 0(-1)   | 2(1)                  | 12(-1)               | 5(-1) | 1,5(1)           | 0/12(1)                | 0,71          | 3,22 | 5,17 | 6,95 |
| 3      | 30(1)        | 8,0(1)              | 4(1)                                | 0(-1)                  | 0(-1)   | 0(-1)                 | 24(1)                | 5(-1) | 0,5(-1)          | 0/12(1)                | 0,36          | 1,41 | 5,25 | 8,05 |
| 4      | 30(1)        | 8,0(1)              | 4(1)                                | 4(1)                   | 0(-1)   | 0(-1)                 | 12(-1)               | 7(1)  | 0,5(-1)          | 12/0(-1)               | 0,00          | 0,00 | 6,86 | 7,85 |
| 5      | 10(-1)       | 8,0(1)              | 4(1)                                | 4(1)                   | 4(1)    | 0(-1)                 | 12(-1)               | 5(-1) | 1,5(1)           | 12/0(-1)               | 0,08          | 0,00 | 5,15 | 7,83 |
| 6      | 30(1)        | 2,0(-1)             | 4(1)                                | 4(1)                   | 4(1)    | 2(1)                  | 12(-1)               | 5(-1) | 0,5(-1)          | 0/12(1)                | 0,30          | 0,00 | 5,13 | 7,91 |
| 7      | 10(-1)       | 8,0(1)              | 0(-1)                               | 4(1)                   | 4(1)    | 2(1)                  | 24(1)                | 5(-1) | 0,5(-1)          | 12/0(-1)               | 0,00          | 0,03 | 5,08 | 6,97 |
| 8      | 30(1)        | 2,0(-1)             | 4(1)                                | 0(-1)                  | 4(1)    | 2(1)                  | 24(1)                | 7(1)  | 0,5(-1)          | 12/0(-1)               | 1,00          | 0,42 | 6,68 | 8,16 |
| 9      | 30(1)        | 8,0(1)              | 0(-1)                               | 4(1)                   | 0(-1)   | 2(1)                  | 24(1)                | 7(1)  | 1,5(1)           | 12/0(-1)               | 0,38          | 0,22 | 6,61 | 6,97 |
| 10     | 10(-1)       | 8,0(1)              | 4(1)                                | 0(-1)                  | 4(1)    | 0(-1)                 | 24(1)                | 7(1)  | 1,5(1)           | 0/12(1)                | 2,17          | 1,19 | 6,85 | 8,05 |
| 11     | 10(-1)       | 2,0(-1)             | 4(1)                                | 4(1)                   | 0(-1)   | 2(1)                  | 12(-1)               | 7(1)  | 1,5(1)           | 0/12(1)                | 1,28          | 1,93 | 6,83 | 7,82 |
| 12     | 30(1)        | 2,0(-1)             | 0(-1)                               | 4(1)                   | 4(1)    | 0(-1)                 | 24(1)                | 5(-1) | 1,5(1)           | 0/12(1)                | 2,16          | 0,00 | 5,27 | 6,92 |
| 13     | 10(-1)       | 8,0(1)              | 0(-1)                               | 0(-1)                  | 4(1)    | 2(1)                  | 12(-1)               | 7(1)  | 0,5(-1)          | 0/12(1)                | 0,83          | 0,80 | 6,73 | 6,93 |
| 14     | 10(-1)       | 2,0(-1)             | 4(1)                                | 0(-1)                  | 0(-1)   | 2(1)                  | 24(1)                | 5(-1) | 1,5(1)           | 12/0(-1)               | 0,00          | 1,98 | 5,58 | 8,23 |
| 15     | 10(-1)       | 2,0(-1)             | 0(-1)                               | 4(1)                   | 0(-1)   | 0(-1)                 | 24(1)                | 7(1)  | 0,5(-1)          | 0/12(1)                | 0,00          | 2,92 | 6,81 | 6,90 |
| 16     | 10(-1)       | 2,0(-1)             | 0(-1)                               | 0(-1)                  | 0(-1)   | 0(-1)                 | 12(-1)               | 5(-1) | 0,5(-1)          | 12/0(-1)               | 0,00          | 1,46 | 5,21 | 7,06 |
| 17     | 20(0)        | 5,0(0)              | 2(0)                                | 2(0)                   | 2(0)    | 1(0)                  | 18(0)                | 6(0)  | 1,0(0)           | 6/6(0)                 | 0,00          | 2,12 | 6,06 | 7,77 |
| 18     | 20(0)        | 5,0(0)              | 2(0)                                | 2(0)                   | 2(0)    | 1(0)                  | 18(0)                | 6(0)  | 1,0(0)           | 6/6(0)                 | 0,00          | 1,26 | 6,07 | 7,78 |
| 19     | 20(0)        | 5,0(0)              | 2(0)                                | 2(0)                   | 2(0)    | 1(0)                  | 18(0)                | 6(0)  | 1,0(0)           | 6/6(0)                 | 0,00          | 2,48 | 6,78 | 7,78 |

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram pouca diferença em relação aos testes preliminares. A máxima atividade lipolítica obtida foi de 3,22 U/mL após 48 horas de fermentação, demonstrando que as diferentes condições avaliadas não promoveram melhora significativa na atividade lipolítica da levedura selecionada. A análise dos efeitos principais das variáveis após 48 horas de processo está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 – Efeitos principais sobre a atividade lipolítica da levedura silvestre AAV1 após 48 horas de fermentação

| Variável                        | Efeito<br>(U/mL) | Erro padrão<br>(U/mL) | t(8)  | p-valor |
|---------------------------------|------------------|-----------------------|-------|---------|
| Média                           | 1,14             | 0,20                  | 5,62  | <0,01*  |
| Sacarose                        | -0,61            | 0,44                  | -1,38 | 0,21    |
| Extrato de levedura             | -0,25            | 0,44                  | -0,57 | 0,58    |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | -0,24            | 0,44                  | -0,54 | 0,61    |
| NH <sub>4</sub> Cl              | -0,70            | 0,44                  | -1,57 | 0,15*   |
| KCl                             | -1,32            | 0,44                  | -2,98 | 0,02*   |
| MgSO <sub>4</sub>               | 0,18             | 0,44                  | 0,41  | 0,69    |
| Tempo de inóculo                | 0,07             | 0,44                  | 0,16  | 0,87    |
| pH                              | -0,06            | 0,44                  | -0,12 | 0,90    |
| Óleo soja                       | 0,21             | 0,44                  | 0,48  | 0,65    |
| Hidrolisado de levedura/AMM     | 0,90             | 0,44                  | 2,03  | 0,08*   |

\* Valores estatisticamente significativos com  $p \leq 0,15$ .

A partir da análise de efeitos nota-se que todas as variáveis analisadas em relação à concentração de nutrientes no inóculo não tiveram efeito ou tiveram efeito negativo sobre a atividade lipolítica dentro das faixas estudadas. Comparando-se com os resultados obtidos nos testes preliminares, há um indicativo de que a levedura adaptou – se melhor e atingiu uma maior atividade lipolítica quando foi cultivada em um meio de inóculo igual ao meio de fermentação, como se pode observar na Tabela 2. A introdução dos nutrientes sacarose, extrato de levedura e os sais citados acima foi uma tentativa de melhorar a qualidade do

inóculo para promover um aumento da atividade lipolítica da levedura, mas através do delineamento experimental verificou-se que tais nutrientes não são necessários a produção de lipase por esta levedura e não levaram a uma melhora na atividade lipolítica. Tempo de inóculo, pH e concentração de óleo de soja também não apresentaram efeito significativo na faixa avaliada.

A única variável explorada que mostrou um resultado interessante sobre a atividade lipolítica foi a relação entre as concentrações de hidrolisado de levedura e água de maceração de milho. Nota-se que ao substituir-se o hidrolisado de levedura pela água de maceração de milho houve um incremento da atividade lipolítica, o que sugere que este substrato é melhor para a produção de lipase para essa levedura. Os resultados obtidos para a levedura AAV1 são interessantes, mas mostram-se bem aquém dos valores de atividade lipolítica obtidos para os fungos do gênero *Geotrichum* e de outros micro-organismos relatados na literatura.

### 3.3. Avaliação da produção de lipase por *Fusarium oxysporum*

Os resultados obtidos no primeiro teste para produção de lipase pelo fungo *Fusarium oxysporum* estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Produção de lipase por *Fusarium oxysporum* com diferentes meios de fermentação em frascos agitados a 30°C e 150 rpm

| Meio de fermentação | Atividade 24h (U/mL) | Atividade 48h (U/mL) | Atividade 72h (U/mL) | pH 24h | pH 48h | pH 72h |
|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------|--------|--------|
| 1                   | 0,00                 | 0,00                 | 0,3 ± 0,2            | 6,77   | 7,25   | 7,43   |
| 2                   | 0,76 ± 0,09          | 1,0 ± 0,1            | 0,5 ± 0,3            | 7,83   | 7,87   | 8,19   |
| 3                   | 0,00                 | 0,00                 | 0,00                 | 7,42   | 7,72   | 7,55   |
| 4                   | 0,00                 | 0,00                 | 0,7 ± 0,3            | 7,14   | 8,16   | 8,21   |

Os resultados obtidos para produção de lipase por *Fusarium oxysporium* foram bastante baixos, com uma atividade enzimática máxima em torno de 1,0 U/mL. Em outro trabalho utilizando o mesmo fungo (Prazeres, 2006) obteve-se 5,0 U/mL após 96 horas de fermentação. Como se trata de um fungo, o procedimento de inóculo adotado, feito através de uma suspensão de esporos obtidos diretamente do micro-organismo cultivado em meio sólido e em seguida, transferida para o meio de fermentação, pode ter levado a uma pior adaptação do fungo ao meio de fermentação. Isso pode ser explicado devido as condições de crescimento serem bem diferentes nestes dois tipos de meio. Além disso, ressuspender os esporos em água destilada e inocular um volume pré-determinado de tal suspensão pode levar a grande variação na contagem inicial de células fúngicas, o que leva a um impacto significativo nos resultados da fermentação, conforme foi verificado anteriormente (Burkert 2003) na produção de lipase pelo fungo *Geotrichum candidum*.

Desta forma, um segundo ensaio foi realizado para produção de lipase com *Fusarium oxysporum* utilizando as condições de inóculo modificadas (Burkert 2003), em que após o cultivo do micro-organismo em meio sólido, um área circular de 1 cm de diâmetro é transferida para um meio de inóculo e é incubado por 15 horas e após este tempo faz-se a inoculação do micro-organismo no meio de fermentação. Os resultados do segundo ensaio estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Produção de lipase por *Fusarium oxysporum* com meio sintético e meio industrial em frascos agitados a 30°C e 150 rpm

| Meio de fermentação | Atividade 24h (U/mL) | Atividade 48h (U/mL) | Atividade 72h (U/mL) | Atividade 170h (U/mL) | pH 24h | pH 48h | pH 72h | pH 170h |
|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|--------|--------|--------|---------|
| 1                   | 1,8 ± 0,6            | 1,6 ± 0,2            | 3,9 ± 0,2            | 3,32 ± 0,03           | 7,93   | 7,92   | 8,30   | 8,68    |
| 2                   | 1,8 ± 0,2            | 0,94 ± 0,04          | 2,03 ± 0,08          | 3,38 ± 0,00           | 7,86   | 7,99   | 8,09   | 8,86    |

\* Fonte de nitrogênio: meio 1 = peptona; meio 2 = água de maceração de milho; fonte de carbono = óleo de soja

Observa-se pelo segundo experimento, que a modificação do procedimento de inóculo levou a um incremento da atividade lipolítica. Comparando-se as tabelas 5 e 6 nota-se que os meios que apresentavam as mesmas fontes de nitrogênio apresentaram melhores resultados no segundo experimento com as alterações nas condições de inóculo. Com a peptona como fonte de nitrogênio, houve um aumento de cerca de 8 vezes na atividade lipolítica após 72 horas de fermentação, que passou de 0,5 (meio 2, Tabela 5) para 3,9 U/mL (meio 1, Tabela 6). No caso da água de maceração de milho, o aumento foi de cerca de 3 vezes na atividade enzimática no mesmo período, que passou de 0,7 (meio 4, Tabela 5) para 2,03 U/mL (meio 2, tabela 6). Tais resultados sugerem que o *Fusarium oxysporum* apresenta potencial para produzir níveis mais elevados de lipase, desde que selecionadas melhores condições de cultivo para este micro-organismo.

Outro resultado bastante interessante é o dado de atividade lipolítica após 170 horas de incubação. Nota-se que o pH do meio de fermentação encontrava-se acima de 8,0 após 72 horas de processo e continuou aumentando no intervalo até 170 horas de processo, no entanto, a atividade lipolítica não foi significativamente prejudicada por este pH elevado no meio de fermentação, mesmo após longo período de tempo, observando-se uma atividade lipolítica praticamente igual nos dois tempos analisados (72 e 170 horas) para o meio 1 (peptona) e um aumento da atividade lipolítica no caso do meio 2 (água de maceração de milho). Este resultado mostra que a lipase produzida por *Fusarium oxysporum* apresenta uma estabilidade bem maior a pH alcalinos quando comparada com as lipases obtidas por *Geotrichum candidum* NRRLY-552, cuja meia-vida diminui de forma bastante acentuada quando esta enzima encontra-se em pH acima de 8,0 (Maldonado 2006). O resultado obtido indica que a lipase de *Fusarium oxysporum* pode ter diferentes aplicações devido a esta característica de maior estabilidade em pH alcalino.

#### **4. CONCLUSÃO**

Os experimentos realizados mostraram que os fungos do gênero *Geotrichum* utilizados apresentaram melhores resultados de atividade lipolítica e por este motivo foram selecionados para a continuidade dos trabalhos, uma vez que uma alta atividade lipolítica é

requerida para a produção de biodiesel a partir de óleos vegetais. No entanto, como sugestão para trabalhos futuros pode-se avaliar a produção de lipase pelos outros micro-organismos, procurando estudar outras faixas de concentração, outros nutrientes e condições de cultivo com intuito de aumentar a atividade lipolítica. Além disso, pode-se avaliar a especificidade das lipases obtidas por estes micro-organismos que podem ser aplicados para outros processos. Por exemplo, no caso do *Fusarium oxysporum*, a lipase produzida apresentou uma boa estabilidade ao pH alcalino, característica que pode ser explorada em outros sistemas reacionais.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brozzoli, V., Crognale, S., Sampedro, I., Federici, F., D'Annibale, A., Petruccioli, M. (2009). Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. *Bioresource Technology*, 100 (13), 3395-3402.
2. Burkert, J.F.M. (2003). Otimização das condições de produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas,.
3. Burkert, J.F.M., Maugeri, F., Rodrigues, M.I. (2004). Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technology*, 91, 77-84.
4. Burkert, J.F.M., Maldonado, R.R., Maugeri, F., Rodrigues, M.I.(2005). Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 61-67.
5. Ciafardini, G., Zullo, B.A., Iride, A. (2006). Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. *Food Microbiology*, 23 (1), 60-67.

6. Goldeback, R. (2008). Triagem, produção e avaliação da atividade da enzima lipase a partir de leveduras silvestres. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
7. Hernalsteens, S. (2006). Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
8. Kamimura, E.S., Mendieta, O., Sato, H.H., Pastore, G., Maugeri, F. Production of lipase from *Geotrichum sp.* and adsorption studies on affinity resin. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 16(2), 103-112.
9. Loo, J.L., Lai, O.M., Long, K., Ghazali, H.M.(2007). Fatty acid preference of mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Geotrichum candidum*. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 23, 1771-1778.
10. Maldonado, R.R., Panciera, A.L., Macedo, G.A., Mazutti, M.A. Maugeri, F., Rodrigues, M.I.(2012A). Improvement of lipase production from *Geotrichum sp.* in shaken flasks. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, doi: 10.2298/CICEQ 120124022M.
11. Maldonado, R.R., Burkert, J.F.M., Mazutti, M.A., Maugeri, F., Rodrigues, M.I.(2012B). Evaluation of lipase production by *Geotrichum candidum* in shaken flasks and bench-scale stirred bioreactor using different impellers. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(2), 147-151.
12. Maldonado, R.R.(2006). Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

13. Maldonado, R.R., Burkert, J.F.M., Rodrigues, M.I.(2001). Produção de Lipase por *Penicillium restrictum*. IX Congresso Interno de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
14. Medeiros, J.F. (1999). Estudo do meio de cultura para produção de lipase por *Geotrichum* sp. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
15. Miranda, O.A., Salgueiro, A.A., Pimentel, M.C.B., Lima Filho, J.L., Melo, E.H.M., Duran, N.(1999). Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. *Bioresource Technology*, 69, 145-147.
16. Pastore, G.M., Costa, V.S.R., Koblitz, M.G.B.(2003). Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23(2), 135-140.
17. Pio, T.F., Macedo, G.A.(2008). Cutinase production by *Fusarium oxysporum* in liquid medium using central composite design *Journal of Industrial of Microbiology*, 35, 59-67.
18. Prazeres, J.N. (2006). Produção, purificação e caracterização da lipase alcalina de *Fusarium oxysporum*. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp.
19. Yan, J-Y., Yan, Y-J.(2008). Optimization for producing cell-bound lipase from *Geotrichum* sp. and synthesis of methyl oleate in microaqueous solvent. *Applied Microbiology Biotechnology*, 78, 431-439.

**Improvement of lipase production from *Geotrichum sp.* in shaken flasks**

Rafael Resende Maldonado<sup>3a</sup>, André Luiz Panciera<sup>a</sup>, Gabriela Alves Macedo<sup>b</sup>, Marcio A. Mazutti<sup>c</sup>, Francisco Maugeri<sup>a</sup> and Maria Isabel Rodrigues<sup>a</sup>

*Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, doi: 10.2298/CICEQ  
120124022M, 2012

<sup>a</sup> Department of Food Engineering, University of Campinas, P.O. Box 6121, Campinas - SP, 13083-862 – Brazil

<sup>b</sup> Department of Food Science, University of Campinas, P.O. Box 6121, Campinas - SP, 13083-862 – Brazil

<sup>c</sup> Department of Chemical Engineering - Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

---

<sup>3</sup> **Email:** [ratafta@fea.unicamp.br](mailto:ratafta@fea.unicamp.br) (R.R. Maldonado)

## ABSTRACT

This work is focused on the study of different factors on inoculum build-up aiming to improve the lipase production by *Geotrichum* sp. by means a sequential strategy of the experimental design. The effects of inoculum size, corn steep liquor concentration, volume of inoculum, pH of medium, age of inoculums and soybean oil concentration on lipase activity were assessed by means of two factorial experimental designs. A maximum lipase activity of  $35.20 \pm 0.8$  U/mL was obtained with a inoculum composed of one circular area of  $0.78\text{cm}^2$  contains spores, 50 mL of inoculum volume medium, 12 hours of inoculum age, 15% w/v of corn steep liquor concentration, 1.0%w/v of soybean oil concentration and initial pH 5.0 at 30°C and 150 rpm in flasks. This work showed that an enhancement of lipase activity can be obtained using a sequential statistical factorial approach to define the variables for inoculum build-up.

*Key words: lipase; corn steep liquor Geotrichum sp.; soybean oil; factorial design.*

## 1. INTRODUCTION

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) are able to bring about the hydrolysis of triacylglycerols into fatty acids and glycerol at the water-lipid interface and its reverse reaction in non aqueous solvents [1]. The microbial production of lipase has been object of several investigations due to the important implications of this enzyme in direct and reversed biotransformation reactions [2, 3]. Frequently, lipases are used in hydrolysis process at oil-water interface, but these enzymes have great versatility and can be used in different processes as oil-chemical, food, fuel, medicine, etc.

Lipases are produced by a wide range of microorganisms, including bacteria [4-6], fungi [7], and yeast [8-10]. Lipases produced by different microorganisms have different application according to their specificity. Lipases from *Geotrichum* sp. and *Geotrichum candidum* have specificity for unsaturated long-chain fatty acids that allows their utilization in hydrolysis process with various vegetable oils like olive oil and soybean oil [3, 11]. Griebeler et al. [12] selected potential lipase producer microorganisms from soybean bran and dairy products. The authors found a fungus with good action in the hydrolysis of triacylglycerol different chain length and another with long-chain fatty acids.

The influence of culture medium composition on production of enzymes has been reported in literature, mainly focusing on the use of agro-industrial residues as substrates [13]. In previous reports, different substrates like olive oil, Tween 80, glucose, citric acid, triolein, peptone, soybean meal, corn steep liquor, yeast extract, urea,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , etc., have been frequently used for lipase production by *Geotrichum* sp. [9, 14-16]. Peptone, yeast hydrolyzed, yeast extract and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  have also been employed for lipase production by *Geotrichum candidum* [17, 18]. The inoculum is also an important variable when imperfect fungus like *Geotrichum* is used in fermentation process. A good inoculum is essential to improve the production of the metabolite of interest and to reduce the experimental error found in such fermentations.

Based on this aspect, this work is focused on the study of different factors on inoculum build-up aiming to improve the lipase production by *Geotrichum* sp. by means a

sequential strategy of the experimental design. Initially, a Plackett-Burman design (PB) was carried out to evaluate the effects of inoculum size (1 to 3 circular disk with 0.78cm<sup>2</sup> containing spores), volume of inoculum (50 to 150 mL), inoculum age (10 to 20 hours), corn steep liquor concentration (8 to 16% w/v), soybean oil concentration (0.2 to 1.0% w/v) and initial pH (5.0 to 7.0). Based on the results of PB design, a 2<sup>4-1</sup> fractional factorial design was carried out to test the effects of inoculum age (8 to 16 hours), corn steep liquor concentration (10 to 20% w/v), soybean oil concentration (0.5 to 1.5% w/v) and initial pH (4.0 to 6.0) maintaining constant the inoculum size and volume of inoculum at one circular area and 50 mL, respectively.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Strain and cultivation conditions**

*Geotrichum* sp. isolated in Biochemistry Laboratory (FEA/DCA/UNICAMP) in Brazil was maintained on yeast malt agar slants and stored at 4°C. Before this work the inoculums build-up is based on the re-suspension of the stock culture into 20 mL of distilled water. Then, a suspension of 5 mL was transferred to erlenmeyers of 1000 mL containing 200 mL of inoculum. The medium for inoculum contained (wt%) corn steep liquor 5.0, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.5, and soybean oil 1.0 were incubated at 30°C and 120 rpm for 24 hours. However, was found many difficulties to maintain the homogeneity of the inoculums and, thus, reduce the experimental error found in the fermentations.

Based on this a new procedure was evaluated in previous tests, obtaining good results. In this procedure, the strain was grown in yeast malt agar in Petri dish and incubated at 30°C for 48 h and the inoculum was prepared by adding colonized agar plugs (0.78 cm<sup>2</sup> of area) to flasks containing the volume of inoculum defined by the experimental design and incubated for different times. The inoculum was composed of peptone (Difico) 5.0%, NaNO<sub>3</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub> 0.1% and soybean oil 1%. Aliquots of 10 mL of this inoculum were added to 500 mL Erlenmeyer flasks and grown for 16, 24 or 32 hours depending of the experimental design under orbital shaking (150 rpm) at 30°C. Aliquots of fermentation medium were periodically sampled and subsequently analyzed for lipase activity.

## **2.2. Lipase assay**

Lipase activity was determined using a microtitrimetric assay with 0.05M NaOH, and emulsified olive oil as the substrate [14].

## **2.3. Screening variables of inoculum and medium composition**

The choice of the best strategy of experimental design is a function of the number of the independent variables that are being evaluated and of the initial knowledge about the process. Normally, the initial operational conditions are distant from the global optimum, so it is preferable to carry out a screening design, as Plackett-Burman (PB), to identify the most influential variables and to adjust their respective range levels. Then a new screening design or a Central Composite Rotational Design (CCRD) could be carried out [19].

In this study six variables were selected to start the inoculum build-up through a PB experimental design with 12 trials and 3 central points. The PB design investigated the effects of inoculum size (1 to 3 circular disk with 0.78cm<sup>2</sup> containing spores), volume of inoculum (50 to 150 mL), inoculum age (10 to 20 hours), corn steep liquor concentration (8 to 16% w/v), soybean oil concentration (0.2 to 1.0% w/v) and initial pH (5.0 to 7.0). Lipase activity was measured after 8, 12 and 16 hours and results were analyzed by software Statistica 8.0 (StatSoft®) to verify the main effects of these variables on lipase activity.

A 2<sup>4-1</sup> fractional factorial design carried out to test the variables selected in the first experimental design. The selected variables here were inoculum age (8 to 16 hours), corn steep liquor concentration (10 to 20% w/v), soybean oil concentration (0.5 to 1.5% w/v) and initial pH (4.0 to 6.0). Inoculum size and volume of inoculum were fixed in one circular area and 50 mL, respectively. Lipase activity was measured after 8, 16 and 24 hours and results were analyzed in the same way described earlier.

## **2.4. Experimental validation of maximized lipase production**

Four different conditions were selected based on the results of 2<sup>4-1</sup> fractional factorial design to obtain the best conditions of lipase production. Three trials for each

condition were carried out and lipase activity was measured after 8, 16, 24 and 32 hours of fermentation and results were submitted to Tukey's test at 90% of confidence level.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Screening variables of inoculum and medium composition

In the first factorial experimental design, lipase activity was analyzed after 8, 12 and 16 hours. The results are showed in table 1.

Table 1. Plackett Burman experimental design to lipase production from *Geotrichum* sp. after 16 hours of fermentation.

| Trial | Variables  |     |                             |       |                      |      |                     |       |               |        |            | Lipase activity (U/mL) |       |
|-------|--|-----|-----------------------------|-------|----------------------|------|---------------------|-------|---------------|--------|------------|------------------------|-------|
|       | Inoculum size (circular disks with 0.78cm <sup>2</sup> ) |     | Inoculum medium volume (mL) |       | Inoculum age (hours) |      | [Corn steep liquor] |       | [Soybean oil] |        | Initial pH |                        |       |
| 1     | 1  | (3) | -1                          | (50)  | 1                    | (20) | -1                  | (8%)  | -1            | (0.2%) | -1         | (5)                    | 11.55 |
| 2     | 1  | (3) | 1                           | (150) | -1                   | (10) | 1                   | (16%) | -1            | (0.2%) | -1         | (5)                    | 11.55 |
| 3     | -1   | (1) | 1                           | (150) | 1                    | (20) | -1                  | (8%)  | 1             | (1.0%) | -1         | (5)                    | 15.49 |
| 4     | 1  | (3) | -1                          | (50)  | 1                    | (20) | 1                   | (16%) | -1            | (0.2%) | 1          | (7)                    | 11.46 |
| 5     | 1  | (3) | 1                           | (150) | -1                   | (10) | 1                   | (16%) | 1             | (1.0%) | -1         | (5)                    | 14.95 |
| 6     | 1  | (3) | 1                           | (150) | 1                    | (20) | -1                  | (8%)  | 1             | (1.0%) | 1          | (7)                    | 11.34 |
| 7     | -1   | (1) | 1                           | (150) | 1                    | (20) | 1                   | (16%) | -1            | (0.2%) | 1          | (7)                    | 10.14 |
| 8     | -1   | (1) | -1                          | (50)  | 1                    | (20) | 1                   | (16%) | 1             | (1.0%) | -1         | (5)                    | 20.86 |
| 9     | -1   | (1) | -1                          | (50)  | -1                   | (10) | 1                   | (16%) | 1             | (1.0%) | 1          | (7)                    | 15.76 |
| 10    | 1  | (3) | -1                          | (50)  | -1                   | (10) | -1                  | (8%)  | 1             | (1.0%) | 1          | (7)                    | 14.78 |
| 11    | -1   | (1) | 1                           | (150) | -1                   | (10) | -1                  | (8%)  | -1            | (0.2%) | 1          | (7)                    | 11.32 |
| 12    | -1   | (1) | -1                          | (50)  | -1                   | (10) | -1                  | (8%)  | -1            | (0.2%) | -1         | (5)                    | 11.45 |
| 13    | 0  | (2) | 0                           | (100) | 0                    | (15) | 0                   | (12%) | 0             | (0.6%) | 0          | (6)                    | 11.92 |
| 14    | 0  | (2) | 0                           | (100) | 0                    | (15) | 0                   | (12%) | 0             | (0.6%) | 0          | (6)                    | 11.45 |
| 15    | 0  | (2) | 0                           | (100) | 0                    | (15) | 0                   | (12%) | 0             | (0.6%) | 0          | (6)                    | 11.69 |

\* Real values in parenthesis

The best result was 20.86 U/mL, obtained in trial 8 (1 circular area of inoculum size, 50mL of inoculum, 20 hours of inoculum age, 16% w/v of corn steep liquor, 1.0% w/v of soybean oil and initial pH of 5). The main effects were calculated considering a significance level of 90% ( $p < 0.10$ ), which are presented in Table 2.

Table 2. Effect on lipase activity by *Geotrichum* sp. after 16 hours of fermentation

| Variable                | Effect (U/mL) | Standard Error (U/mL) | t(8)         | p-value           |
|-------------------------|---------------|-----------------------|--------------|-------------------|
| <b>Average activity</b> | <b>13.05</b>  | <b>0.42</b>           | <b>31.00</b> | <b>&lt;0.01*</b>  |
| Inoculum size           | -1.56         | 0.94                  | -1.66        | 0.13              |
| <b>Inoculum volume</b>  | <b>-1.84</b>  | <b>0.94</b>           | <b>-1.96</b> | <b>0.09*</b>      |
| Inoculum age            | 0.17          | 0.94                  | 0.18         | 0.86              |
| Corn steep liquor       | 1.47          | 0.94                  | 1.56         | 0.16              |
| <b>Soybean oil</b>      | <b>4.28</b>   | <b>0.94</b>           | <b>4.55</b>  | <b>&lt; 0.01*</b> |
| <b>Initial pH</b>       | <b>-1.84</b>  | <b>0.94</b>           | <b>-1.95</b> | <b>0.09*</b>      |

\* significant effects with  $p < 0.10$

According to Table 2, two variables showed negative effect on lipase activity: inoculum volume ( $p = 0.09$ ) and initial pH ( $p = 0.09$ ). This means that lipase activity was higher when these variables were used at level -1. Then the inoculum volume was fixed at the lowest level (50 mL), because it was difficult to reduce considerably this variable. For initial pH, lower values are possible and a range from 4.0 to 6.0 was then selected for the second factorial experimental design.

Three variables did not have significant effect after 16 hours: inoculums size ( $p = 0.13$ ), inoculum age ( $p = 0.86$ ) and corn steep liquor concentration ( $p = 0.16$ ). Inoculum size was fixed at level -1 because one circular area presented satisfactory results concerning the lipase production. We decided to test the inoculums age at a lower range (from 8 to 16 hours) to reduce the total fermentation time. Corn steep liquor concentration also did not have a significant effect on lipase production. Thus a higher range (from 10 to 20% w/v)

was select for the next experimental design to check if this variable would have a significant effect on lipase production at a higher concentration range.

Soybean oil concentration presented a positive effect ( $p < 0.01$ ) on lipase activity and its concentration was increased to the range from 0.5 to 1.5% w/v. This experimental design was carried out to select the most important variables for the definition of medium, but the maximum value obtained in this experiment (20.86 U/mL after 16 hours) was similar to the result obtained in a previous work, which was 18.0 U/mL after 24 hours, with the same microorganism and substrate [9]. So, a second experimental design was defined according to these results obtained in the first experimental design, which is shown in Table 3.

Table 3. Fractional factorial design  $2^{4-1}$  to lipase production by *Geotrichum* sp. after 24 hours of fermentation

| Trial | Variables            |                     |               |            | Lipase activity (U/mL) |
|-------|----------------------|---------------------|---------------|------------|------------------------|
|       | Inoculum age (hours) | [Corn steep liquor] | [Soybean oil] | Initial pH |                        |
| 1     | -1 (8)               | -1 (10%)            | -1 (0.5%)     | -1 (4)     | 24.61                  |
| 2     | 1 (16)               | -1 (10%)            | -1 (0.5%)     | 1 (6)      | 23.26                  |
| 3     | -1 (8)               | 1 (20%)             | -1 (0.5%)     | 1 (6)      | 20.08                  |
| 4     | 1 (16)               | 1 (20%)             | -1 (0.5%)     | -1 (4)     | 24.09                  |
| 5     | -1 (8)               | -1 (10%)            | 1 (1.5%)      | 1 (6)      | 23.36                  |
| 6     | 1 (16)               | -1 (10%)            | 1 (1.5%)      | -1 (4)     | 24.05                  |
| 7     | -1 (8)               | 1 (20%)             | 1 (1.5%)      | -1 (4)     | 20.49                  |
| 8     | 1 (16)               | 1 (20%)             | 1 (1.5%)      | 1 (6)      | 18.92                  |
| 9     | 0 (12)               | 0 (15%)             | 0 (1.0%)      | 0 (5)      | 20.34                  |
| 10    | 0 (12)               | 0 (15%)             | 0 (1.0%)      | 0 (5)      | 28.34                  |
| 11    | 0 (12)               | 0 (15%)             | 0 (1.0%)      | 0 (5)      | 28.28                  |

\* real values in parenthesis

The best results were obtained at central points of the experimental design, with average lipase activity of  $(25.6 \pm 4.6)$  U/mL. This value is statistically similar to the average lipase activity considering the different treatments (trials 1 to 8), which was  $(22.4 \pm 2.2)$  U/mL. The main effects of independent variables were calculated from data of Table 3, but all effects were not significant in the evaluated range (data not shown). This result indicates that all conditions used in this experimental design can be used to obtain high level of lipase activity. Analyzing the results in both experimental designs it is possible to see that lipase activity is more than twice higher than the central points in PB ( $11.68 \pm 0.24$ ) U/mL and the central points in  $2^{4-1}$  factorial design ( $25.65 \pm 4.62$ ) U/mL. These results showed that the changes in levels of variables studied produced an improvement in lipase activity.

### **3.2. Experimental validation of optimized conditions**

The four conditions chosen to validate the results obtained are showed in Table 4 and the profile of lipase activity during fermentation time is showed in Figure 1.

Table 4. Lipase activity from *Geotrichum* sp. after 32 hours of fermentation.

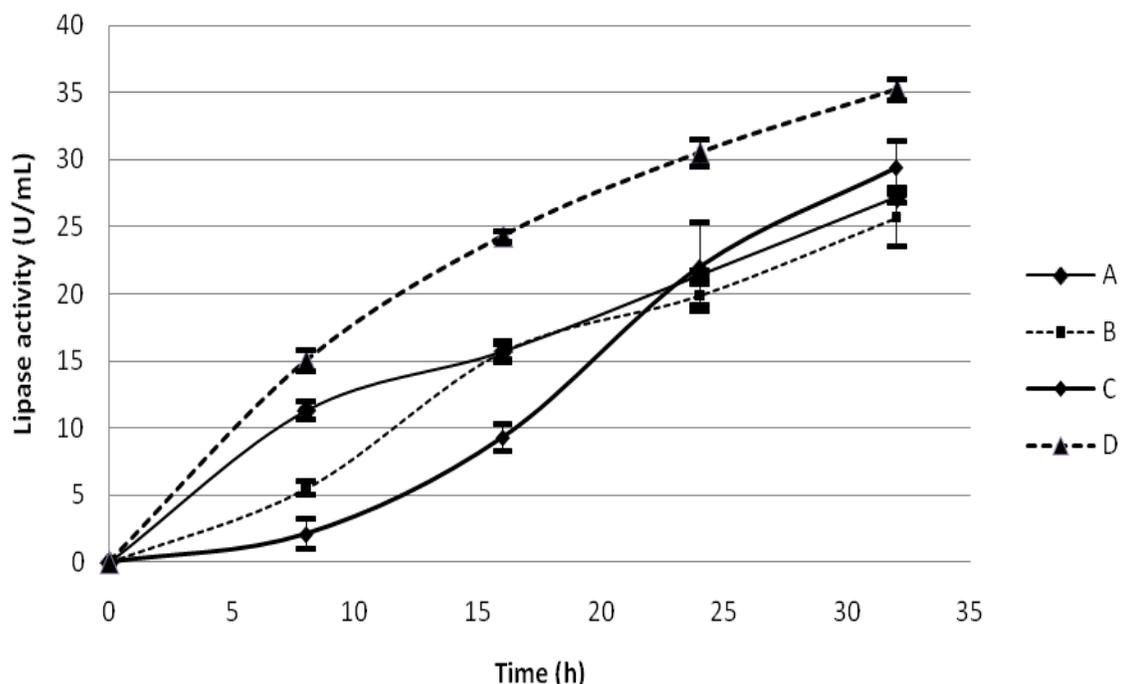
| Trial | Lipase activity<br>(U/ml) | Average<br>(U/mL) | Standard Error<br>(U/mL) | Fermentation<br>conditions |
|-------|---------------------------|-------------------|--------------------------|----------------------------|
| A1    | 27.73                     |                   |                          | 10%w/v CSL                 |
| A2    | 27.13                     | 27.2 <sup>a</sup> | 0.40                     | 0.5% SO                    |
| A3    | 26.90                     |                   |                          | pH 4.0                     |
| B1    | 24.03                     |                   |                          | 15%w/v CSL                 |
| B2    | 28.14                     | 25.7 <sup>a</sup> | 2.20                     | 1.0% SO                    |
| B3    | 24.84                     |                   |                          | pH 5.0                     |
| C1    | 27.24                     |                   |                          | 10%w/v CSL                 |
| C2    | 29.85                     | 29.4 <sup>b</sup> | 2.00                     | 0.5% SO                    |
| C3    | 31.25                     |                   |                          | pH 4.0                     |
| D1    | 34.63                     |                   |                          | 15%w/v CSL                 |
| D2    | 36.10                     | 35.2 <sup>c</sup> | 0.80                     | 1.0% SO                    |
| D3    | 34.92                     |                   |                          | pH 5.0                     |

\* A and D with 12 hours of inoculum age; B and C with 8 hours of inoculum age.

\*\* CSL = corn steep liquor; SO = soybean oil

\*\*\*Averages with different letters have significant difference at 95% of confidence interval.

Figure 1. Lipase activity profile during fermentation time.



The analysis of variance (ANOVA) was carried out and the minimum significant difference (MSD) was calculated at 95% of confidence level, which resulted in 2.01 U/mL after 32 hours of fermentation.

According to results of the analysis of variance, the condition D was selected as the best for lipase production by *Geotrichum* sp., because of its highest lipase activity and a significant difference compared to the other conditions. This condition is the same that one used in central point of the second experimental design, which showed the best result. Then, this test validated the information obtained in previous experimental design. Condition D yielded 35.2 U/mL of lipase activity, value 2 times higher than that obtained in a previous work, using the same microorganism [9], reducing the fermentation time from 48 to 32 hours.

Gopinath et al. [10] evaluated the lipase production from *Geotrichum candidum* using synthetic medium and obtained 89.6 U/mL after 6 days of fermentation at 30°C. Loo

et al. [18] obtained a maximum lipase activity of 22.6 U/mL from *Geotrichum candidum* using peptone and yeast extract after 54 hours of fermentation. Kamimura et al. [20] evaluated the lipase production from *Geotrichum* sp. in a bench-scale bioreactor using corn steep liquor obtaining a maximum lipase activity of 28 U/mL after 10 hours of fermentation at 1 vvm, 400 rpm and 30°C. Yan and Yan [21] evaluated 13 variables in the lipase production using *Geotrichum* sp. in a rotating shaker and obtained a maximum lipase activity of 23.2 U/mL after 24 hours of fermentation.

#### **4. CONCLUSION**

This work evaluated six variables during the inoculums build-up to improve the lipase production by *Geotrichum* sp. by means a sequential strategy of the experimental design. A maximum lipase activity of 35.20±0.8 U/mL was obtained with a inoculum build-up composed of one circular area of 0.78cm<sup>2</sup> contains spores, 50 mL of inoculum volume medium, 12 hours of inoculum age, 15% w/v of corn steep liquor concentration, 1.0%w/v of soybean oil concentration and initial pH 5.0 at 30°C and 150 rpm in flasks. This result is 95% and 52% higher than previous works that studied optimization of lipase production with the same microorganism [9, 21] and showed a low value to experimental error, which is very difficult for this kind of microorganism.

#### **5. ACKNOWLEDGMENTS**

The authors wish to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the scholarships.

#### **6. REFERENCES**

- [1] K.E. Jaeger, M.T. Reetz, Trends Biotechnol. **16** (1998) 396-403.
- [2] F. Hansan, A.A. Shah, A. Hameed, Enzyme Microb. Technol. **39** (2006) 235-251.
- [3] H. Treichel, D. Oliveira, M.A. Mazutti, M. Di Luccio, J.V. Oliveira, Food Bioprocess Technol. **3** (2010) 182-196.

- [4] C.S. Lee, J.Y. Jung, J.S. So, E.K. Kim, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2** (1997) 11-14.
- [5] K.E. Jaeger, S. Ransac, B.W. Dijkstra, C. Colson, M. van Heuvel, O. Misset, *FEMS Microbiol. Rev.* **15** (1994) 29-63.
- [6] G. Volpato, R.C. Rodrigues, J. X. Heck, M.A.Z. Ayub, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **14** (2009) 105-111.
- [7] V.K. Garlapati, R. Banerjee, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **15** (2010) 254-260.
- [8] P. Rapp, S. Backhaus, *Enzyme Microb. Technol.* **14** (1992) 938-943.
- [9] J.F.M. Burkert, F. Maugeri, M.I. Rodrigues, *Bioresour. Technol.* **91** (2004) 77-84.
- [10] S.C.B. Gopinath, A. Hilda, T.L. Priya, G. Annadurai, P. Anbu, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **19** (2003) 681-689.
- [11] T. Jacobsen, O.M. Poulsen, *Can. J. Microbiol.* **38** (1992) 75-80.
- [12] N. Griebeler, A.E. Polloni, F.A. Remonato, R. Vardanega, J.L. Cechet, M. Di Luccio, D. Oliveira, H. Treichel, R.L. Cansian, E. Rigo, J.L. Ninow, *Food Bioprocess Technol.* (2009) DOI 10.1007/s11947-008-0176-5.
- [13] R. Sharma, Y. Chist, U. Banerjee, *Enzyme Microb. Technol.* **19** (2001) 627-662.
- [14] E.S. Kamimura, O. Medieta, M.I. Rodrigues, F. Maugeri, *Appl. Biochem. Biotech.* **33** (2001) 153-159.
- [15] T. Jacobsen, B. Jensen, J. Olsen, K. Allermann, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32** (1989) 256-261.
- [16] M. Zarevúcka, Z. Kejik, D. Sarnan, Z. Wimmer, K. Demnerová, *Enzyme Microb. Technol.* **37** (2005) 481-486.
- [17] R.R. Maldonado, MSc. dissertation. Campinas, São Paulo: University of Campinas. Department of Food Engineering (2006).

- [18] J.L. Loo, O.M. Lai, K. Long, H.M. Ghazali, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23** (2007) 1771-1778.
- [19] M.I. Rodrigues, A.F. Iemma, *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos*. 2ª. Edição (2010).
- [20] E.S. Kamimura, O. Mendieta-Taboada, H.H. Sato, G. Pastore, F. Maugeri, *Braz. J. Chem. Eng.* **16** (1999) 102-112.
- [21] J.Y. Yan, Y.J. Yan, *Appl. Microb. Biotechnol.* **78** (2008) 431-439.

**CAPÍTULO IV – PURIFICAÇÃO PARCIAL E IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE**

***Geotrichum candidum* NRRLY-552**

**Partial purification and immobilization of lipase from**

***Geotrichum candidum* NRRLY-552.**

Rafael Resende Maldonado<sup>4a</sup>, Felipe Masiero Fogaça<sup>a</sup>, Gabriela Giolo Ramos<sup>a</sup>, Gabriela Alves Macedo<sup>b</sup>, Marcio A. Mazutti<sup>c</sup> and Maria Isabel Rodrigues<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Food Engineering, University of Campinas, P.O. Box 6121, Campinas - SP, 13083-862 – Brazil

<sup>b</sup> Department of Food Science, University of Campinas, P.O. Box 6121, Campinas - SP, 13083-862 – Brazil

<sup>c</sup> Department of Chemical Engineering - Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

**Artigo elaborado para submissão para revista**

***Journal of Microencapsulation***

---

<sup>4</sup> Rafael R. Maldonado, Department of Food Engineering, University of Campinas, P.O. Box 6121, Campinas - SP, 13083-862 – Brazil. Fax: +551935214027. E-mail: ratafta@yahoo.com.br

## **ABSTRACT**

This work studied partial purification and immobilization of lipase from *Geotrichum candidum* NRRLY-552 with different supports. The partial purification was evaluated by precipitation of enzyme using ammonium sulphate or ethanol following lyophilization. It was obtained an enzyme with maximum purification factor of 56 and 66 times respectively. The lipase activity ranged from 400 to 900 U/g and the processes were very easy because had two or three steps until it obtained lipase purified. Immobilization process was evaluated with four different supports: calcium alginate, graphite-niobium, zeolite and Celite. In all situations the efficiency of immobilization was not so good, but the immobilization with Celite exhibited good lipase activity around 90 U/g and it can be a good alternative to lipase immobilization if conditions of immobilization will be optimized.

*Key words: lipase; purification; immobilization; hydrolysis*

## 1. INTRODUÇÃO

Lipases podem ter diversas aplicações industriais como, por exemplo, em indústrias de alimentos, medicamentos, couro, detergentes, óleos e gorduras, biocombustíveis, etc. Neste trabalho, o objetivo principal foi utilizar lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 para obtenção de hidrolisado de óleo de vegetais como etapa prévia à produção de biodiesel. Relatos da literatura demonstram que processos de hidrólise, esterificação e transesterificação de óleos vegetais podem ser catalisados com sucesso por lipases microbianas (Fukuda et al., 2001).

No entanto, é importante salientar que o nível de atividade lipolítica exigida para utilização das lipases em processos de hidrólise e posteriormente em esterificação a partir de óleos vegetais é relativamente elevado. Obteve-se uma condição ótima para produção de biodiesel utilizando células imobilizadas de *Rhizopus chinensis* como fonte de lipase, com uma relação de 24,5 U/ g óleo, com no máximo de 20% m/m de água em relação a quantidade de óleo (Qin et al., 2008). A utilização de alta concentração enzimática de lipase requer preparados enzimáticos com alta atividade enzimática, pois a solubilidade de preparados enzimáticos liofilizados em óleos vegetais é limitada. Tal situação leva muitas vezes a utilização de lipases comerciais de alto grau de pureza, o que aumenta consideravelmente os custos de produção. Por outro lado é importante salientar que a água é um fator importante no processo. No caso das reações de hidrólise, ela é necessária à conversão dos triacilgliceróis em ácidos graxos livres, porém nas reações de esterificação e transesterificação ela se torna um fator limitante do processo, especialmente quando se pretende a utilização de etanol no processo. Sendo assim, torna-se necessário a utilização de preparados enzimáticos e sistemas reacionais com baixo teor de água para um melhor rendimento na obtenção do biocombustível, o que inviabiliza o uso de lipases brutas, levando a necessidade de aplicar algum processo prévio de purificação.

Outro ponto a ser destacado é que o consumo de enzima é elevado quando se pensa em aplicações industriais, o que leva a necessidade de procurar formas de imobilização da enzima com o intuito de reutilizá-la por diversos ciclos de reação. Um grande número de

trabalhos relatados na literatura faz uso de enzimas imobilizadas a fim de se obter hidrolisado de óleos vegetais e para produção de biodiesel.

Desta forma, nesta etapa do trabalho, buscou-se avançar em duas frentes. Por um lado, realizou-se um estudo de purificação parcial da lipase bruta de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 com intuito de obter um preparado enzimático com elevada atividade lipolítica e reduzido teor de água. Por outro lado, procurou-se formas de realizar a imobilização da enzima com intuito de reutilizá-la em vários ciclos de reação.

Para a purificação parcial da enzima foram utilizados três métodos diferentes para obtenção dos preparados enzimáticos:

- Precipitação com sulfato de amônio até 80% de saturação;
- Precipitação com etanol;
- Concentração direta a partir do caldo bruto fermentado.

Na maioria dos tratamentos, após precipitação enzimática, o concentrado obtido foi liofilizado para redução da quantidade de água, aumento da concentração e da estabilidade enzimática. No estudo da imobilização enzimática foram testadas a imobilização em diferentes suportes - alginato de cálcio, nióbio-grafite, zeólita 13X-Na e Celite.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Precipitação da lipase com sulfato de amônio**

A lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 foi produzida através de fermentação submersa utilizando condições otimizadas (Maldonado, 2006). A etapa de purificação foi feita através da precipitação por adição de sulfato de amônio,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ao caldo bruto até a concentração de sal equivalente a 80% de saturação, a 4°C. A solução obtida foi armazenada em geladeira (4°C) por 24 horas e, então, centrifugada a 8.000 rpm por 15 minutos para separação do precipitado. Após a separação, o precipitado foi ressuspenso em um pequeno volume de solução tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0 e a

solução resultante, acondicionada em um saco de celulose próprio para diálise. Esse foi fechado e colocado em um recipiente com água destilada a 4°C para remoção do excesso de sulfato de amônio (diálise) por 24 horas, com troca periódica da água utilizada. A solução dialisada foi congelada em placas de Petri em camadas finas e depois liofilizada por um período de dois a três dias obtendo-se um pó codificado como LS. Em alguns experimentos, repetiu-se o procedimento acima, excluindo-se a etapa de diálise.

## **2.2. Liofilização direta do caldo fermentado**

A lipase obtida por fermentação submersa foi congelada, a partir do caldo bruto, em placas de Petri e liofilizada por dois dias. O liofilizado obtido foi codificado LD.

## **2.3. Precipitação da lipase com etanol**

A precipitação enzimática foi realizada através da adição de etanol (99% v/v) ao caldo bruto contendo a lipase. O etanol foi gotejado a uma velocidade de 3,5 mL/min, em sistema com agitação magnética e temperatura controlada de 2°C, na razão de 2:1 em relação ao volume de caldo bruto. O volume de cada batelada foi calculado de modo que o tempo máximo de contato com o etanol fosse de no máximo duas horas, para reduzir as perdas por desnaturação. O precipitado foi separado por centrifugação a 8.000 rpm por 15 minutos. Amostras do precipitado foram avaliadas com e sem liofilização para efeito de comparação. Os concentrados assim obtidos foram codificados LEt.

## **2.4. Determinação da atividade lipolítica e outros parâmetros dos preparados enzimáticos**

A atividade lipolítica dos preparados enzimáticos foi determinada por análise titulométrica (Macedo & Pastore, 1997). Para realização da análise dissolveu-se cerca de 0,1 g do preparado enzimático em 10 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0 e utilizou-se 1 mL desta solução para análise de atividade.

A partir dos resultados de atividade lipolítica foram calculados os fatores de concentração (FC) e de recuperação (FR). O fator de concentração (FC) foi definido como

sendo a razão entre a atividade lipolítica do preparado enzimático (U/g) e a atividade lipolítica do caldo bruto (U/mL). O fator de recuperação (FR), como a razão entre a quantidade total de enzima obtida no preparado enzimático (U total) e a quantidade total da enzima no caldo bruto (U total).

Para o concentrado obtido por precipitação com etanol sem liofilização, determinou-se o período de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), pois a enzima apresenta considerável perda de atividade ao longo do tempo, devido ao contato com o etanol. A meia vida é definida como o tempo em que a atividade de enzima reduz-se à metade do valor original.

## **2.5. Determinação da estabilidade dos preparados enzimáticos na presença de solventes orgânicos**

A estabilidade dos preparados enzimáticos obtidos foi testada em dois solventes orgânicos – etanol e hexano. Para ambos os solventes, pesou-se cerca de 0,1 g da enzima liofilizada, dissolveu-se em 10 mL de solução tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0, adicionou-se 10 mL do solvente e incubou-se o sistema resultante a 37°C por 6, 12 e 24 horas, no caso do etanol e 12 e 24 horas, no caso do hexano. Após este período realizou-se a análise de atividade lipolítica (Macedo & Pastore, 1997). Foram avaliados os preparados enzimáticos obtido por precipitação com sulfato de amônio (LS) e com etanol (LEt).

## **2.6. Imobilização enzimática da lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 em alginato de cálcio**

Partiu-se do caldo bruto da fermentação com *Geotrichum candidum* NRRLY-552, com atividade lipolítica de 15,0 U/mL. Foram misturados 5,0 mL do caldo bruto com 3,5 mL de glutaraldeído e 0,75 g de carvão ativo ANFC e a mistura foi deixada em repouso por 30 minutos, a 37°C. Na sequência, a mistura acima foi homogeneizada a uma solução de alginato de cálcio (16,5 g de água e 0,75 g de alginato de cálcio) e gotejada em uma solução de tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0, contendo 0,2 mol/L de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), com velocidade de gotejamento de 0,7 mL/min, para formação de esferas contendo a enzima imobilizada. As esferas obtidas permaneceram em repouso *overnight* em geladeira (4°C) e

após este período foram lavadas com tampão fosfato 0,1 mol/L pH = 7,0. (Aguiar et al., 2012). Determinou-se a atividade lipolítica da enzima imobilizada utilizando-se 100 mg das esferas obtidas (Macedo & Pastore, 1997).

### **2.7. Imobilização enzimática da lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 em liga de nióbio-grafite**

Avaliou-se a possibilidade de imobilizar a lipase bruta (15 U/mL) em uma liga nióbio grafite (95:5%) NB-340. Em um primeiro ensaio foram testadas cinco quantidades de enzima (30, 60, 90, 120 e 150 U lipase). Para realização do ensaio pesou-se 1,0 g de nióbio grafite em placa de Petri e adicionou-se a solução enzimática (caldo bruto) de modo a atingir a atividade desejada. Um segundo ensaio foi realizado com quantidades reduzidas da enzima (10, 20, 30, 40 e 50 U). Em ambos os ensaios, a solução enzimática ficou em contato com o suporte inorgânico por 19 horas, sem agitação, sob refrigeração a 4°C. Após este período, lavou-se o suporte com solução tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0. (Aguiar-Oliveira et al., 2012). Amostras de 100 mg de cada imobilização foram utilizadas para determinação da atividade lipolítica da enzima imobilizada (Macedo & Pastore, 1997).

### **2.8. Imobilização enzimática da lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 em zeólita**

A zeólita 13X-Na foi triturada com auxílio de um pistilo. Pesou-se 1,0036 g de zeólita e misturou-se com 0,0251 g de enzima (LEt) com atividade de 900 U/g e 30 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0. A mistura ficou em repouso por 24 horas a 4°C. Após este período, o material foi congelado e liofilizado por 4 dias. Mediu-se a atividade lipolítica do preparado (Macedo & Pastore, 1997) e a ação hidrolítica do preparado enzimático na hidrólise do óleo de soja em reator com agitação magnética, utilizando-se 5 g de óleo; 0,75 g de água (15% m/m) e 0,5 g da enzima (10% m/m) nas temperaturas de 34 e 40° C, com 12 horas de reação (Maldonado et al., 2009). A enzima foi reutilizada na hidrólise do óleo de soja para verificar a eficiência da imobilização após o reuso, sob as mesmas condições acima, à temperatura de 34° C.

### **2.9. Imobilização enzimática da lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 em Celite**

Pesou-se 1,0 g de Celite e adicionou-se 0,50 g de enzima (LEt) com atividade de 900 U/g e 30 mL de solução tampão fosfato 30 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0. A mistura ficou em repouso por 24 horas a 4°C. Após este período, o material foi congelado e liofilizado por 4 dias. Avaliou-se a atividade lipolítica do preparado obtido.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. Purificação da enzima**

Vários lotes de enzimas foram tratados segundo os métodos descritos no item anterior e os resultados podem ser visualizados na Tabela 1. Os lotes de concentrados foram divididos por método de concentração utilizado.

Tabela 1 – Resultados da purificação parcial da lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 por diferentes métodos

| Lote | Método de concentração   | Atividade do caldo bruto (U/mL) | Atividade do preparado enzimático (U/g) | Fator de concentração | Fator de recuperação (%) |
|------|--|---------------------------------|---|-----------------------|--------------------------|
| 1    | Precipitação com   | 14,0                            | 789                                     | 56,4                  | 123,0                    |
| 2    | sulfato de amônio  | 14,0                            | 623                                     | 44,5                  | 132,0                    |
| 3    | + diálise +<br>liofilização  | 8,0                             | 407                                     | 50,9                  | 162,0                    |
| 4    | Precipitação com<br>sulfato de amônio<br>sem diálise +<br>liofilização | 14,6                            | 408                                     | 27,9                  | 94,4                     |
| 5    | Precipitação com   | 10,0                            | 632                                     | 63,2                  | 63,2                     |
| 6    | etanol +<br>liofilização   | 14,0                            | 925                                     | 66,0                  | 56,3                     |
| 7    | Precipitação com   | 14,6                            | 300                                     | 20,5                  | 29,5                     |
| 8    | etanol sem   | 14,0                            | 165                                     | 11,8                  | 48,6                     |
| 9    | liofilização   | 9,9                             | 135                                     | 13,7                  | 32,5                     |
| 10   | Liofilização<br>direta   | 14,0                            | 522                                     | 37,2                  | 94,0                     |

Nas amostras tratadas com sulfato de amônio (lotes 1 a 4) observou-se uma grande variação no fator de concentração, que pode ter sido ocasionado por diferentes aspectos tais

como: tempo de contato do agente precipitante com a enzima, realização de diálise, tempo de diálise, tempo de liofilização, a atividade lipolítica inicial, etc. Tais resultados, no entanto apresentam-se dentro da mesma ordem de grandeza comparado com a purificação da lipase de *Rhizopus* sp. com sulfato de amônio a 70% da saturação que atingiu um fator de concentração de 50 vezes (Koblitz & Pastore, 2006).

A comparação dos lotes 1 a 3 com o lote 4, mostra a influência da diálise sobre o processo de purificação. Tanto o fator de concentração como o de purificação foram significativamente menores no ensaio em que não se realizou a diálise. A realização da diálise reduz a concentração de sulfato de amônio em contato com a enzima, o que reduz a chance de desnaturação enzimática durante a purificação.

Os lotes 1 a 3 apresentaram um fator de recuperação superior a 100%, demonstrando um aumento da atividade lipolítica total da enzima purificada em comparação com a enzima bruta. Tal fato não é comum de acontecer em processos de purificação enzimática, mas há relatos da ocorrência de hiperativação enzimática dependendo do tratamento realizado. Verificou-se um aumento de 2000% na atividade enzimática total da lipase de *H. lanuginosa* comparando-se a enzima imobilizada em suporte hidrofóbico (octil-agarose) com a enzima bruta (Bastida et al., 1998). Também se observou fatores de purificação superiores a 100% após a purificação da lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 por cromatografia de interação hidrofóbica com butyl-Sepharose (Maldonado, 2006). O contato prolongado da enzima com alta concentração de sulfato de amônio reduziu esta hiperativação, conforme pode ser visto no resultado do lote 4. Tal fato também foi notado durante a adsorção de lipases em octil-agarose que apresentaram menores valores de atividade lipolítica na presença de concentrações mais elevadas de sulfato de amônio (Bastida et al., 1997).

A liofilização direta (lote 10) foi realizada com intuito de reduzir o número de etapas do processo, realizando simplesmente uma concentração da enzima apenas por liofilização do caldo bruto, sem precipitação prévia. Vários lotes foram testados desta forma, mas a maior parte deles apresentou consistência pastosa, baixa homogeneidade e

alta higroscopicidade quando expostos as condições ambientes. Apenas um lote apresentou condições de uso após a liofilização, mesmo assim os fatores de concentração e de purificação, comparados aos obtidos com a enzima tratada com sulfato de amônio, foram inferiores. Também devido à falta de reprodutibilidade deste método concluiu-se que não seria possível dispensar uma etapa de precipitação antes da liofilização.

O método de precipitação utilizando etanol foi testado devido aos bons resultados obtidos para a concentração da enzima frutossiltransferase (Aguiar-Oliveira et al., 2012). Além disso, este método é bastante rápido comparado com a precipitação com sulfato de amônio, que requer ao menos de dois dias para precipitação e diálise antes de se realizar a liofilização, enquanto o método de precipitação com etanol é feito em aproximadamente duas horas, o que reduz consideravelmente o tempo de processo e o custo energético. Outro fator interessante é que o resíduo gerado neste caso é uma solução hidroalcolólica, que pode ser reaproveitada tanto para precipitação de outros lotes de enzima, ser recuperada através de destilação ou mesmo utilizada para produção de biodiesel, o que diminui a quantidade de resíduos no processo, melhorando-o do ponto de vista ambiental e do consumo de matéria-prima.

A partir dos resultados mostrados na Tabela 1 pode-se observar que a lipase é mais sensível ao contato com o etanol do que ao sulfato de amônio como agente precipitante, o que era esperado uma vez que um dos principais problemas na produção de biocombustíveis por via enzimática é justamente a estabilidade enzimática em relação a alcoóis de cadeia curta (caráter polar). No entanto, observa-se que em alguns casos, fatores de recuperação da ordem de 50 a 60%, podem ser considerados satisfatórios frente à economia de tempo no processo e dependendo da concentração enzimática e estabilidade do liofilizado obtido. A perda de atividade enzimática total (U total) observada com esse método pode ser considerada relativamente pequena (da ordem de 40%) comparada a outras enzimas. A influência do etanol na atividade enzimática de transglutaminase foi avaliada observando-se uma perda de atividade enzimática de 85% quando incubada por 1 hora em solução contendo 50% de etanol em temperatura ambiente (Cui et al, 2008).

A etapa de liofilização foi determinante para a estabilidade da enzima purificada com etanol. Comparativamente os lotes 5 e 6 (precipitação com etanol + liofilização) apresentaram atividade lipolítica, fatores de concentração e recuperação bastante superiores em relação aos lotes 7 a 9 (apenas precipitação com etanol). Tal fato pode ser explicado pela drástica redução da quantidade de água e etanol na enzima liofilizada comparada com aquela que não sofreu tal tratamento. O contato do etanol com a enzima após a precipitação também contribuiu para o aumento na desnaturação, o que leva a resultados piores do que aqueles obtidos com o produto liofilizado.

Comparando-se o processo de precipitação com etanol e com sulfato de amônio percebe-se que há uma redução no fator de recuperação, com maior desnaturação da enzima tratada com etanol, porém os fatores de concentração obtidos foram superiores no tratamento com etanol. Considerando-se que o processo com etanol é bem mais rápido, a utilização deste pode ser uma alternativa bastante interessante ao método tradicional de purificação com sulfato de amônio.

### **3.2. Estabilidade dos preparados enzimáticos na presença de solventes orgânicos**

No caso dos tratamentos com etanol sem liofilização, avaliou-se o comportamento da atividade enzimática do precipitado ao longo do tempo de armazenamento para observar como o etanol influencia na perda de atividade lipolítica. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Atividade enzimática da lipase L<sub>Et</sub> não liofilizada em função do tempo de armazenamento a 4°C.

| Tempo (dias) | Atividade (U/g) |
|--------------|-----------------|
| 0            | 135,0           |
| 1            | 112,0           |
| 2            | 105,0           |
| 5            | 91,2            |
| 7            | 87,5            |

O tratamento analisado neste caso refere-se ao de lote 9 citado na Tabela 1, cuja atividade inicial após o tratamento foi de 135 U/g. Observa-se que ao longo do tempo de armazenamento houve uma redução da atividade lipolítica, o que deve ter ocorrido principalmente devido ao etanol residual presente no precipitado que promoveu a desnaturação enzimática. Com os dados da Tabela 2 foi possível estimar a meia-vida do concentrado (12,4 dias), armazenado a 4°C. Observou-se também que ao longo do tempo houve uma diminuição da massa do precipitado da ordem de 42%, que corresponde, em grande parte, a perda de etanol e de umidade por evaporação.

Considerando-se a perda de massa do precipitado e a diminuição da atividade lipolítica, após 7 dias a quantidade de enzima residual presente no precipitado era de 12% em relação a quantidade de enzima no caldo bruto. Esta observação reafirma o fato de que a enzima é bastante sensível ao contato com etanol, mesmo em temperaturas baixas e que a liofilização é um bom método para eliminar esse etanol residual e garantir maior estabilidade da enzima.

Visto que na etapa de concentração utilizando etanol como agente precipitante houve uma considerável perda de atividade enzimática, decidiu-se realizar um estudo de estabilidade dos preparados enzimáticos obtidos frente aos solventes orgânicos etanol

(utilizado para produção do biodiesel) e hexano (comumente relatado na literatura como solvente que preserva bem a atividade enzimática das lipases). Partiu-se de amostras de lipase tratada com sulfato de amônio codificada como LS, com atividade inicial de 508 U/g e lipase tratada com etanol codificada como LEt, com 479 U/g. Os resultados obtidos após a incubação por 6, 12 e 24 horas estão apresentados na Figura 1.

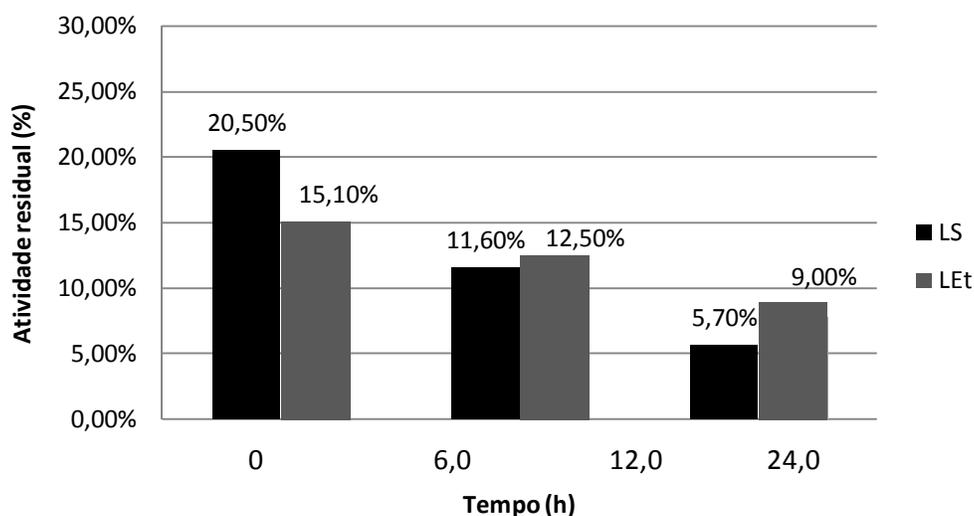


Figura 1 – Atividade residual dos preparados enzimáticos (LS e LEt) após incubação com etanol, a 37° C.

Através da Figura 1 é possível notar que os preparados enzimáticos são bastante sensíveis ao contato com o etanol, demonstrando que a lipase realmente apresenta uma baixa estabilidade na presença deste solvente. A lipase LS teve sua atividade reduzida a 20% do valor inicial e a lipase LEt, para 15% do valor inicial, com apenas 6 horas de incubação, o que representa uma atividade residual muito baixa para curto tempo de incubação. Em trabalho relatado na literatura também foi observada baixa estabilidade da lipase na síntese de espumas de poliuretano associada ao efeito inibitório do acúmulo de etanol no meio de produção (Cabral, Fonseca e Dias, 2010). Por sua vez, a lipase de *Rhizopus* sp. apresentou retenção de mais de 90% da atividade lipolítica em solventes apróticos (acetonitrila, acetona e acetato de etila), mas teve redução da atividade para cerca

de 40% em solventes próticos como etanol e isopropanol (Rodríguez et al., 2009). Em termos de aplicações industriais, a baixa estabilidade das lipases frente ao etanol e outros alcoóis é um importante fator limitante que precisa ser considerado.

Na avaliação da estabilidade do preparado enzimático na presença de hexano, houve a formação de um sistema bifásico devido à presença da água utilizada para solubilizar os preparados enzimáticos, uma vez que estes se mostraram praticamente insolúveis no solvente orgânico. A atividade lipolítica foi avaliada nas duas fases do sistema (aquosa e orgânica) e os resultados estão apresentados na Figura 2.

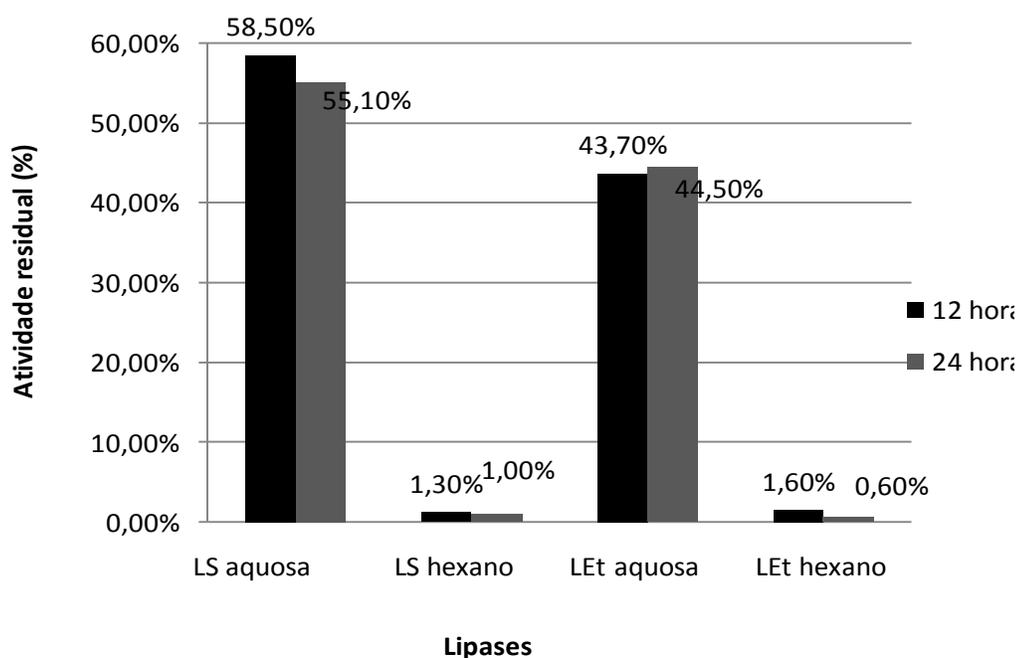


Figura 2 – Atividade residual dos preparados enzimáticos (LS e LEt) após incubação com hexano a 37° C.

Os resultados obtidos demonstram que apenas uma pequena parte da lipase migrou da fase aquosa para a fase orgânica (hexano), mostrando a maior afinidade da enzima liofilizada com a fase polar do que com a fase apolar. Além disso, é possível perceber uma perda considerável da atividade enzimática nas horas iniciais de incubação na fase aquosa, mas entre 12 e 24 horas praticamente não houve perda na atividade da enzima.

Em relação à fase orgânica é difícil chegar a uma conclusão sobre a estabilidade da enzima nesta fase, uma vez que a quantidade de enzima que migrou da fase aquosa para a fase orgânica foi muito pequena (pouco mais de 1%). As variações verificadas na estabilidade entre 12 e 24 horas estão dentro do erro do método analítico, não podendo ser necessariamente atribuídas a ação do solvente. Na literatura é recorrente o relato da utilização de solventes de baixa polaridade como forma de preservar a atividade das lipases. Observou-se uma retenção de 98% da atividade enzimática da lipase de *Burkholderia multivorans* V2 em hexano após 24 horas (Dandavate et al., 2009) e foi obtida uma lipase de *Pseudomonas aeruginosa* LX1 que também se apresentou estável em diferentes solventes orgânicos como n-hexadecano, isoctano, hexano, dimetilsulfóxido (DMSO) e dimetilformamida (DMF) (Ji et al., 2010).

### 3.3. Imobilização enzimática

Diferentes métodos de imobilização foram avaliados, os principais resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados da imobilização da lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 em diferentes suportes

| Método de imobilização | Atividade lipolítica da enzima livre (U/g) | Atividade lipolítica da enzima imobilizada (U/g) | Eficiência de imobilização* (%) |
|------------------------|--|--|---------------------------------|
| Alginato               | 15,0                                       | 0,90   | 24,0                            |
| Nióbio-grafite         | 15,0                                       | 5,00   | 50,0                            |
| Zeólita                | 900  | 14,8   | 10,2                            |
| Celite                 | 900  | 93,4   | 18,4                            |

\* Eficiência = (atividade enzima imobilizada/ atividade enzima livre)\*100

Na imobilização realizada com alginato de cálcio, a eficiência de imobilização foi semelhante àquela obtida na imobilização da lipase de *Pseudomonas* sp., que foi de 22,2% (Cheirsilp, Jeamjounkhaw e Kittikun, 2009), porém a atividade enzimática foi bem inferior, de 0,90 U/g, em relação ao trabalho supracitado (8,11 U/mL). A baixa atividade enzimática obtida neste experimento pode estar relacionada com a atividade enzimática da enzima livre (lipase bruta com 15,0 U/mL). Ensaio utilizando os preparados enzimáticos, que apresentam atividade inicial bem mais elevada, poderiam resultar em melhor atividade enzimática após a imobilização.

A imobilização da lipase na liga nióbio-grafite por adsorção foi avaliada com atividade lipolítica da enzima livre variando entre 10 e 150 U da enzima. O melhor resultado foi obtido com a menor quantidade de lipase utilizada, demonstrando que tal suporte não apresentou uma boa afinidade para a enzima em questão. O fato de ser uma matriz polar explica o fato dos baixos percentuais de imobilização que foram observados. Outro fato importante observado foi a falta de reprodutibilidade na eficiência de imobilização utilizando-se as mesmas condições.

Não foram encontrados relatos na literatura sobre imobilização de lipase por adsorção em nióbio, mas este suporte foi utilizado para outra enzima, frutossiltransferase, obtendo bons resultados na imobilização (Aguiar-Oliveira et al., 2012). Tal enzima apresenta características muito distintas das lipases avaliadas neste trabalho, no entanto, há relatos da aplicação de nióbio como catalisador heterogêneo para produção de biodiesel. Uma interessante aplicação associou a utilização de uma lipase extraída de sementes germinadas de *Jatropha curcas* L. para hidrólise de óleos vegetais e a do ácido nióbico como catalisador heterogêneo para conversão do hidrolisado obtido em biodiesel por reação com metanol. O biodiesel obtido desta forma apresentou excelentes qualidades físico-químicas tais como viscosidade (5,5 mm<sup>2</sup>/s), composição em éster (97,1% m/m), glicerol (0,09% m/m), metanol residual (0,05% m/m) e ponto de entupimento a frio (0° C), (Sousa et al., 2010).

Apesar dos resultados pouco satisfatórios encontrados para imobilização da lipase na liga nióbio-grafite, a possibilidade de associação de enzimas com catálise heterogênea é um aspecto que merece melhor investigação e foi a justificativa para realização da avaliação da imobilização das lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 nesse suporte.

Na imobilização utilizando zeólita 13X-NA partiu-se de uma atividade lipolítica inicial de 225 U, utilizando o preparado enzimático LEt. Após a imobilização, verificou-se que houve uma retenção de 10,2% da atividade enzimática. O preparado enzimático obtido apresentou uma atividade bastante baixa, de 14,8 U/g, o que corresponde a apenas 1,6% da atividade da enzima livre. Mesmo com baixa atividade lipolítica da enzima imobilizada, foram realizados testes de hidrólise enzimática de óleo de soja com este preparado, conforme condições descritas no item 2.8. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Hidrólise enzimática de óleo de soja em reator encamisado utilizando lipase imobilizada em zeólita 13X-NA após 12 horas de processo.

| Temperatura (°C) | Hidrólise (%) |
|------------------|---------------|
| 34 (1º ciclo)    | 11,0          |
| 34 (2º ciclo)    | 1,6           |
| 40°C             | 3,0           |

Os resultados obtidos demonstram que o aumento da temperatura causou uma redução na taxa de hidrólise, indicando alguma alteração na enzima ao promover a mistura com a zeólita, uma vez que a enzima livre apresentou melhor condição de hidrólise a 45°C (ver resultados detalhados no capítulo V). No que diz respeito à reutilização da enzima, observa-se que já no segundo ciclo houve uma queda significativa na taxa de hidrólise, da ordem de 85%. A causa mais provável é de que o suporte utilizado não conseguiu manter a enzima adsorvida após o 1º ciclo de reação, tendo a enzima se dissolvido no meio reacional. Outra possibilidade seria a desnaturação da enzima nas condições reacionais, o que parece

pouco provável neste caso uma vez que o período de utilização foi de apenas 12 horas no primeiro ciclo de reação.

A lipase de *Candida cylindracea* foi imobilizada em zeólita do tipo Y obtendo 33% de eficiência na imobilização e 35% de atividade lipolítica em comparação com a enzima livre e a enzima manteve 10% da atividade inicial após 70 ciclos de reação na hidrólise do óleo de palma (Knezevic, Mojovic e Adnadjevic, 1998). No entanto em outro estudo foram comparadas a imobilização de lipase em hidrotalcita e zeólitas, verificando que o primeiro suporte foi eficiente para imobilização com uma adsorção de 13 mg proteína/g de suporte enquanto que as zeólitas alcançaram no máximo 9 mg proteína/ g de suporte. Além disso, a lipase imobilizada em zeólita não se mostrou eficiente para realizar a transesterificação de óleo residual de cozinha com metanol em igual condição ao processo realizado com a lipase imobilizada em hidrotalcita<sup>5</sup>, resultado similar ao mostrado na Tabela 4. (Yagiz, Kazan e Akin, 2007).

No experimento de avaliação da imobilização da lipase em Celite obteve-se uma eficiência de imobilização de 18,4% com atividade lipolítica da enzima imobilizada de 93,4 U/g, correspondendo a 9,0% da atividade lipolítica da enzima livre. Apesar do valor da eficiência não ter sido o mais elevado dentre os testes realizados, este foi o suporte que apresentou uma maior atividade lipolítica após a imobilização, o que se deve principalmente ao fato da utilização de uma enzima livre com alta atividade lipolítica (utilizou-se o preparado enzimático LEt ao invés da lipase bruta). Dentre os experimentos realizados, a imobilização com Celite é a que melhores perspectivas apresentaram para a aplicação para hidrólise e esterificação dos óleos vegetais devido à obtenção de alta atividade lipolítica. Obteve-se 34% de eficiência na imobilização da lipase de *Candida rugosa* em Celite (Chang et al., 2007) e 83% de eficiência com a lipase de *Burkholdeira*, atingindo uma atividade na enzima imobilizada de 273,5U/ g Celite, em condições otimizadas (Liu et al., 2009). Tais resultados são um indicativo de que após um estudo de otimização das condições de imobilização da lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552

---

<sup>5</sup> Hidrotalcita é um mineral de fórmula química  $Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3 \cdot 4H_2O$

em Celite, os valores de atividade lipolítica e eficiência de imobilização podem ser bem superiores aos encontrados neste trabalho.

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho demonstram que é possível realizar a purificação parcial da lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 tanto por precipitação com sulfato de amônio quanto com etanol, sendo que o primeiro agente precipitante leva a obtenção de maiores fatores de recuperação enquanto o segundo promove maiores fatores de concentração, que chegam a ser superiores a 60 vezes em relação à enzima bruta. Os preparados enzimáticos obtidos apresentaram baixa estabilidade na presença de etanol, o que é um fator crítico para aplicação em reações de obtenção de biodiesel, sendo necessário mais estudos para melhorar os sistemas reacionais a fim de proteger melhor a enzima da ação desnaturante do etanol ao longo do processo. No que diz respeito aos processos de imobilização, os diferentes suportes analisados apresentaram resultados variados quanto à eficiência de imobilização e atividade da enzima imobilizada, mas todos eles merecem ser melhor estudados por apresentarem potencial de aplicação para esta finalidade. Na comparação entre eles, a imobilização em Celite foi a que apresentou resultados mais satisfatórios com 18% de eficiência e 93,4 U/g de atividade.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguiar-Oliveira E, Fernandes P, Cabral JMS, Maugeri F. Characterization of biocatalysts immobilised in niobium – a new inorganic solid support. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 2012; DOI: 10.1002/cjce.21653.
2. Bastida A, Sabuquillo P, Armisne P, Lafuente RF, Huguet H, Guisa JM. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption

- on strongly hydrophobic supports. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998; 58(5):486-493.
3. Cabral PP, Fonseca MMR, Dias SF. Esterification activity and operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams in the production of ethyl butyrate. *Biochemical Engineering Journal*, 2010; 48 (2):246-252.
  4. Chang S-F, Chang S-W, Yen Y-H, Shieh C-J. Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on Celite by RSM. *Applied Clay Science*, 2007; 37 (1-2): 67-73.
  5. Cheirsilp B, Jeamjounkhaw P, Kittikun AH. Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009; 59 (1-3): 206-211.
  6. Cui L, Du G, Zhang D, Fan X, Chen J. Stability and conformational changes of transglutaminase from *Streptomyces hygroscopicus* in ethanol-aqueous medium. *Process Biochemistry*, 2008; 43: 887-891.
  7. Dandavate V, Jinjala J, Keharia H, Madamwar D. Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. *Bioresource Technology*, 2009; 100 (13): 3374-3381.
  8. Fukuda H, Kondo A, Noda H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001; 92 (5): 405-416..
  9. Ji Q, Xiao S, He B, Liu X. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010; 66 (3-4): 264-269.
  10. Knezevic Z, Mojovic L, Adnadjevic B. Palm oil hydrolysis by lipase from *Candida cylindracea* immobilized on zeolite type Y. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998; 22(4): 275-280.

11. Koblitz M.G.B, Pastore G.M. Purification and biochemical characterization of an extracellular lipase produced by a new strain of *Rhizopus sp.* *Ciência Agrotécnica*, 2006; 30 (3): 494-502.
12. Liu C-H, Lin Y-H, Chen C-Y, Chang J-S. Characterization of *Burkholderia* lipase immobilized on celite carriers. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2009; 40 (4):359-363.
13. Macedo G. A, Pastore G.M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 1997; 17(2): 115-119.
14. Maldonado RR, Fogaça FM, Ramos GG, Macedo GA, Rodrigues MI. Different reactional systems to enzymatic hydrolysis of soybean oil as preliminary phase to biodiesel production. *New Biotechnology*, 2009; 25S: 251.
15. Maldonado R.R. Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 2006.
16. Qin H, Yan X, Yun T, Dong W. Biodiesel Production Catalyzed by Whole-Cell Lipase from *Rhizopus chinesis*. *Chinese Journal of Catalysis*, 2008; 29 (1): 41-46.
17. Rodríguez BH, Córdova J, Bárzana E, Torres EF. Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009; 61 (3-4): 136-142.
18. Sousa JS, Oliveira EAC, Aranda DAG, Freire DMG. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010; 65 (1-4): 133-137,.

19. Yagiz F, Kazan D, Akin N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. *Chemical Engineering Journal*, 2007; 134(1-3): 262-267.

**CAPÍTULO V – HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEOS VEGETAIS**  
**UTILIZANDO LIPASE DE *Geotrichum candidum***

**Hydrolysis of vegetable oils catalysis by lipase from *Geotrichum candidum* NRRLY-552.**

Rafael Resende Maldonado<sup>6a</sup>, Felipe Masiero Fogaça<sup>a</sup>, Gabriela Giolo Ramos<sup>a</sup>, Gabriela Alves Macedo<sup>b</sup>, Marcio A. Mazutti<sup>c</sup> and Maria Isabel Rodrigues<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Food Engineering, University of Campinas, P.O. Box 6121, Campinas - SP, 13083-862 – Brazil

<sup>b</sup> Department of Food Science, University of Campinas, P.O. Box 6121, Campinas - SP, 13083-862 – Brazil

<sup>c</sup> Department of Chemical Engineering - Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

**Artigo elaborado para submissão para revista**

***Bioprocess and Biosystems Engineering***

---

<sup>6</sup> Rafael R. Maldonado, Department of Food Engineering, University of Campinas, P.O. Box 6121, Campinas - SP, 13083-862 – Brazil. Fax: +551935214027. E-mail: ratafta@yahoo.com.br

## ABSTRACT

This work evaluated the enzymatic hydrolysis of vegetable oils using partial purification lipase from *Geotrichum candidum* NRRLY-552. Reaction was analyzed in different agitation systems and it was selected shaken flasks to obtain hydrolysed. Lipase from *Geotrichum candidum* was pre-purified by precipitation with ammonium sulphate following lyophilization obtaining 440 U/g of activity. The best conditions to obtain the hydrolysed of soybean oil was 5.0% w/w of partial purification lipase (equivalent to 22.0 U enzyme per g oil), 15.0% w/w of water, 45°C and 210 rpm which led to hydrolyses of (77±3)% after 24 hours of reaction. This value is very good considering that lipase used was not total purify and the water concentration was low in the system. The same lipase was evaluated in the same conditions to hydrolysis other four vegetable oils - colza, corn, olive and sunflower and the performance was as efficient as to hydrolysis of colza and sunflower oils. This system was developed to be the first step to biodiesel production using hydrolysed of vegetable oils and ethanol through enzymatic pathway.

*Key words: lipase; hydrolysis, vegetable oils, soybean oil, biodiesel*

## 1. INTRODUÇÃO

A obtenção de biocombustível tem sido um assunto muito debatido e estudado recentemente devido à grande necessidade de se alterar a matriz energética mundial no sentido de diminuir os impactos ambientais que foram imensamente aumentados na era pós Revolução Industrial. A produção de biodiesel a partir de óleos vegetais tem sido considerada uma das alternativas bastante promissoras no que diz respeito a combustíveis que sejam ecologicamente corretos, pois a quantidade de carbono que esse combustível gera durante a combustão pode ser compensado pela quantidade de carbono que é absorvido na produção das matérias-primas.

Vários têm sido os métodos utilizados para a produção de biodiesel. Industrialmente este é obtido por rota química, utilizando catalisadores ácidos ou básicos e a partir de metanol como reagente alcoólico. No entanto, tais processos geram grandes quantidades de resíduos e tem a desvantagem do metanol não ser um reagente alcoólico renovável, uma vez que sua principal fonte de obtenção é por reações químicas a partir de derivados do petróleo.

Uma boa opção para melhorar o processo de obtenção de biodiesel é a utilização da via enzimática, que requer condições mais brandas de processo e gera menos resíduos a serem tratados após a obtenção do biocombustível. Aliado a este fator, a sustentabilidade do biodiesel pode ser aumentada se ao invés de metanol utilizar-se etanol proveniente de origem vegetal, o que no caso brasileiro é bastante interessante, uma vez que o país tem larga experiência e um parque industrial desenvolvido para produção de etanol a partir da cana de açúcar.

Sendo assim, este capítulo apresenta uma etapa preliminar para a produção enzimática de biodiesel a partir de óleo de soja e etanol, duas matérias primas abundantes no Brasil. A obtenção do biodiesel pode ser feita por transesterificação direta do óleo vegetal com o reagente alcoólico ou então em duas etapas, sendo uma de hidrólise do óleo vegetal para obtenção de ácidos graxos, seguida de esterificação com o reagente alcoólico.

Inúmeros estudos por ambas as rotas vem sendo realizados nos últimos anos. Neste capítulo foram avaliados diferentes preparados enzimáticos para hidrólise enzimática do óleo de soja, bem como condições de temperatura, agitação em diferentes sistemas e concentração de água no meio reacional.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Ensaio preliminares**

Os ensaios preliminares de hidrólise enzimática do óleo de soja foram realizados de acordo com as condições descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Ensaio preliminares para hidrólise enzimática do óleo de soja por lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552.

| Ensaio | Enzima*  | Condições utilizadas**   |   |
|--------|--|--|---|
| 1      | Lipase bruta (LB)<br><br>10 U/mL   | 14 g de óleo de soja<br><br>4% m/m de água<br><br>0,70 U/g óleo  | T = 40° C<br><br>Banho agitado<br><br>t = 12 horas  |
| 2      | Lipase liofilizada direto do caldo bruto (LD)<br><br>440 U/g               | 0,5 g de óleo de soja<br><br>15% m/m de água<br><br>46,0 a 296 U/g óleo (7,5 a 35% m/m)  | T = 37° C<br><br>Banho agitado<br><br>t = 12 horas  |
| 3      | Lipase precipitada com sulfato de amônio e liofilizada (LS)<br><br>623 U/g | 0,5 g de óleo de soja<br><br>15% m/m de água<br><br>12,5 a 187 U/g óleo (2,0 a 30% m/m)  | T = 37° C<br><br>250 rpm em frascos agitados<br><br>t = 12 horas  |
| 4      | Lipase precipitada com etanol e liofilizada (LEt)<br><br>263 e 397 U/g     | 2,0 g de óleo de soja<br><br>20% m/m de água<br><br>152 U/g óleo (ensaio 4a)<br>350 U/g óleo (ensaio 4b)<br><br>(29 e 44% m/m) | T = 37° C<br><br>250 rpm em frascos agitados (ensaio 4a)<br>Banho agitado (ensaio 4b)<br><br>t = 12 horas |

\* U/mL ou U/g = atividade enzimática; \*\* U/ g óleo = unidades da enzima utilizada por g de óleo; %m/m = massa de água por 100g de óleo.

## 2.2. Estudo da hidrólise enzimática de óleo de soja em frascos agitados.

O processo de hidrólise enzimática utilizando lipase LS (previamente selecionada) foi avaliado inicialmente através de um delineamento completo central rotacional (DCCR)  $2^3 + 6$  pontos axiais + 3 pontos centrais com as variáveis independentes concentração de lipase LS, concentração de água e temperatura. A partir dos resultados obtidos no primeiro delineamento e de alguns ensaios com sistemas agitados (apresentados em itens seguintes), decidiu-se realizar um segundo delineamento completo para hidrólise de óleo de soja com lipase LS para avaliar as variáveis independentes concentração de lipase LS, concentração de água e agitação. As faixas utilizadas nos delineamentos estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Faixas de valores utilizadas para as variáveis independentes nos delineamentos experimentais (DCCR) para hidrólise de óleo de soja com lipase LS de *Geotrichum candidum* NRRLY-552

| Nível                              | -1,68 | -1   | 0   | +1   | +1,68 |
|------------------------------------|-------|------|-----|------|-------|
| Primeiro delineamento experimental |       |      |     |      |       |
| LS* (U/g óleo)                     | 98    | 200  | 350 | 500  | 602   |
| Água (%m/m)                        | 6,6   | 10   | 15  | 20   | 23,4  |
| Temperatura (°C)                   | 32    | 34   | 37  | 40   | 42    |
| Segundo delineamento experimental  |       |      |     |      |       |
| LS** (U/g óleo)                    | 40    | 52,5 | 70  | 87,5 | 100   |
| Água (%m/m)                        | 5     | 7    | 10  | 13   | 15    |
| Agitação (rpm)                     | 50    | 90   | 150 | 210  | 250   |

\*LS com atividade de 623 U/g de enzima; \*\* LS com atividade de 500 U/g enzima

### **2.3. Estudo da influência da temperatura na hidrólise enzimática de óleo de soja em frascos agitados**

Realizou-se um estudo para avaliar a influência da temperatura na hidrólise enzimática do óleo de soja, uma vez que, a faixa de temperatura de trabalho utilizada (37 a 40°C) até este momento, não é a mais adequada para trabalhar com processamento de óleos, que em geral utilizam temperaturas mais elevadas. Avaliou-se a hidrólise do óleo de soja em frascos agitados com temperatura variando entre 37 e 70°C com as seguintes condições reacionais: 0,5 g de óleo de soja (marca Soya), 0,065 g de água (13%*m/m*), 0,100 g de lipase LS (20% *m/m* e 100 U/ g óleo), agitação de 210 rpm. A lipase LS utilizada apresentava uma atividade de 500 U/g enzima. A resposta analisada foi a taxa de hidrólise após 12 horas de reação.

### **2.4. Estudo da influência da concentração enzimática na hidrólise enzimática de óleo de soja em frascos agitados**

Ao longo dos experimentos verificou-se uma dificuldade de solubilização da enzima no meio reacional, com conseqüente redução nas taxas de hidrólise, desta forma realizou-se estudo da influência da concentração enzimática sobre o processo em uma ampla faixa de concentração. Avaliou-se a hidrólise do óleo de soja em frascos agitados com concentração de lipase LS variando entre 1,0 e 20%*m/m* (equivalente a 4,5 até 89,0 U/g óleo) com as seguintes condições reacionais: 5,0 g de óleo de soja (marca Soya), 0,75 g de água (15%*m/m*), agitação de 210 rpm e temperatura de 45°C. A lipase LS utilizada apresentava uma atividade de 445U/g enzima. A resposta analisada foi a taxa de hidrólise após 12 horas de reação.

Um segundo experimento foi realizado com condições pré-selecionadas a partir do experimento anterior. As condições analisadas foram de 2,5; 5,0 e 7,5% *m/m* de LS nas mesmas condições do experimento anterior. A resposta avaliada foi a taxa de hidrólise após 12 e 24 horas de reação.

Realizou-se um experimento em triplicata para avaliar a cinética da reação ao longo do tempo. Utilizaram-se as condições reacionais de 5,0 g de óleo de soja, 15% m/m de água, 5% m/m de lipase LS (22 U/g óleo), temperatura de 45°C e agitação de 210 rpm. A resposta avaliada foi a taxa de hidrólise até 60 horas de reação.

### **2.5. Estudo da hidrólise enzimática de diferentes óleos vegetais em frascos agitados**

Nesta etapa foi avaliada a hidrólise enzimática de 5 diferentes óleos vegetais – soja, milho, canola, oliva e girassol. As condições de reação utilizadas foram: 5,0 g de óleo vegetal, 0,75 g de água (15% m/m), 0,25 g de preparado enzimático LS (5% m/m; 20,7 U/g óleo), temperatura de 45°C e agitação de 210 rpm em frascos agitados. A lipase LS utilizada apresentava uma atividade de 414 U/g enzima. A resposta avaliada foi a taxa de hidrólise após 12 e 24 horas de reação.

### **2.6. Estudo da hidrólise enzimática de óleo de soja em reator encamisado**

No estudo com reator enzimático, foram realizados dois ensaios. No primeiro utilizou-se 10% m/m de LS (equivalente a 64 U/g óleo), 15% m/m de água, temperatura de 37°C e agitação magnética. No segundo, 5% m/m de L<sub>Et</sub> (equivalente a 46 U/g óleo), 15% m/m de água, temperatura de 37°C e agitação magnética. As lipases LS e L<sub>Et</sub> utilizadas apresentavam atividade de 623 e 925 U/g enzima, respectivamente. Em ambos os casos, mediu-se a taxa de hidrólise ao longo do tempo de reação como resposta do processo.

### **2.7. Determinação da taxa de hidrólise**

Para determinação da taxa de hidrólise (%), as amostras são tituladas com hidróxido de sódio 0,05 mol/L com indicador fenolftaleína até o ponto de viragem. Um branco é utilizado para se determinar a quantidade inicial de ácidos graxos livres (AGL) no óleo utilizado no sistema reacional sem a presença da enzima (medida da hidrólise espontânea). O cálculo da porcentagem é feito considerando-se o índice de saponificação do óleo como correspondente a 100% de hidrólise. Nas condições estudadas (hidrolisado de óleo de soja e

titulante solução de NaOH 0,05 mol/L), a porcentagem de hidrólise pode ser determinada pela Equação 1.

$$\% \text{ hidrólise} = [(V_{\text{amostra}} - V_{\text{branco}}) \times 1,47] / m_{\text{óleo na amostra}} \quad (\text{eq. 1})$$

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Resultados preliminares

Os ensaios preliminares tiveram como objetivo estabelecer condições iniciais para realização da hidrólise do óleo de soja com lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552. No primeiro experimento, avaliou-se a lipase bruta (LB) e a resposta obtida foi de 0,25% de hidrólise após 12 horas de processo, valor praticamente nulo. Pelo balanço entre quantidade de óleo e quantidade de enzima, utilizou-se neste experimento 0,7 U/g óleo, o que explica o baixo valor de hidrólise obtido. Verificou-se posteriormente na literatura que a quantidade de lipase necessária à hidrólise de óleos vegetais é bem superior a este nível, como por exemplo, utilizou-se 26 U/g de lipase para realizar a transesterificação de óleo vegetal com a lipase de *Rhizopus chinenses* [1]. Para a utilização de concentração enzimática semelhante ao valor citado, seria necessária a utilização de cerca de 30 mL do caldo bruto, o que aumentaria drasticamente a concentração de água no meio reacional, o que é indesejável para a produção de biodiesel, uma vez que a água interfere negativamente na etapa seguinte de esterificação.

Com intuito de aumentar a concentração enzimática, mas mantendo níveis reduzidos de água no meio reacional, foram utilizados nos experimentos seguintes preparados enzimáticos LD, LS e LEt, que apresentavam atividades lipolíticas bem superiores a lipase bruta (LB), uma vez que tais preparados passaram por processos de concentração e liofilização. O teor de umidade dos preparados enzimáticos utilizados encontrava-se entre 10 e 15% m/m. Os resultados dos testes preliminares com LD e LS estão apresentados na Figura 1.

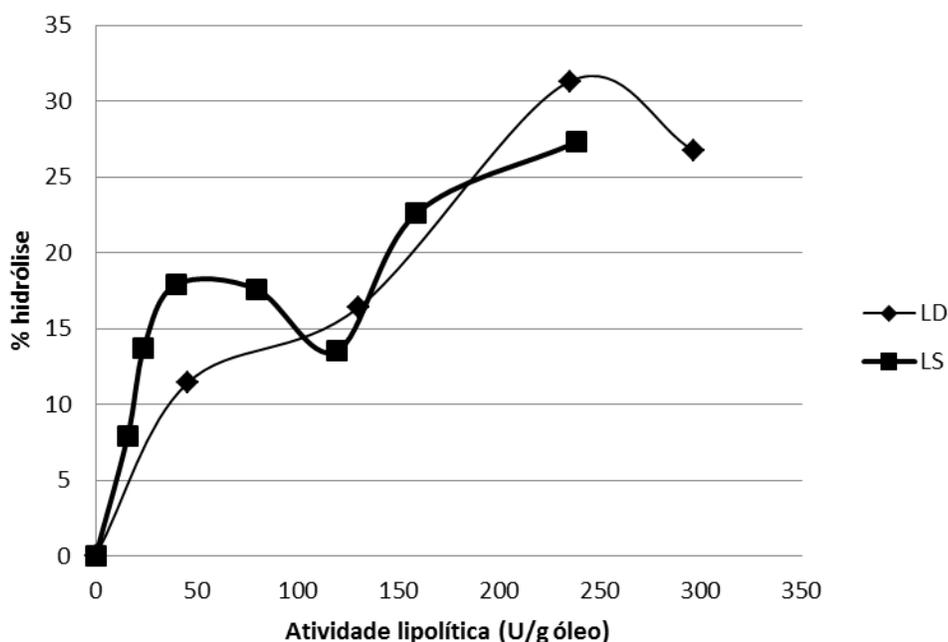


Figura 1 – Perfil de hidrólise enzimática de óleo de soja com diferentes concentrações de LD (440 U/g) e LS (623 U/g) após 12 horas de reação a 37°C.

Pela Figura 1 nota-se que os perfis de hidrólise utilizando os dois preparados enzimáticos foram similares, no entanto no caso da utilização do preparado LS, a porcentagem em massa da enzima utilizada em relação a massa de óleo foi menor, devido a sua maior atividade enzimática (623 U/g), o que facilitou o processo de solubilização da enzima no meio reacional.

As maiores taxas de hidrólise foram obtidas utilizando-se 235 U de lipase LD/g óleo e foram da ordem de 30% após 12 horas de reação. O principal problema verificado em ambos os experimentos foi a utilização de uma grande quantidade em massa dos preparados enzimáticos, o que impediu a completa solubilização da enzima no meio reacional. A agitação realizada em banho agitado não foi suficiente para dissolver toda a enzima na maioria dos ensaios, sendo que parte desta ficou aderida ao fundo e as paredes do frasco, o que certamente comprometeu o desempenho deste sistema reacional devido ao contato limitado entre a enzima e o óleo de soja.

No entanto, uma observação importante pode ser feita: na faixa de concentração enzimática até 5% m/m de lipase, observa-se que a enzima LS tem um desempenho melhor do que LD, isto pode ser justificado por dois fatos – a atividade lipolítica de LS é maior do que de LD e nesta faixa de concentração toda a enzima solubiliza-se no meio reacional. Este fato indica que a solubilização é um fator fundamental para a realização deste processo e a agitação tem papel importante para que a enzima dissolva-se completamente no meio reacional.

Desta forma, para melhorar o processo seria interessante trabalhar com preparados enzimáticos com maior atividade lipolítica, a fim de reduzir a quantidade em massa da enzima utilizada e melhorar a agitação do meio reacional de modo a facilitar a dissolução da enzima e favorecer o processo hidrolítico.

Em relação a quantidade de água, no ensaio com enzima LD foi utilizado 20% m/m e no ensaio com LS, 15% m/m e observa-se que não houve diferenças significativas nos resultados da hidrólise enzimática. Como um dos objetivos desta etapa do trabalho era reduzir a quantidade de água no processo, nos ensaios seguintes procurou-se utilizar concentrações menores desta variável.

Por sua vez, os dois testes utilizando LEt, conforme Tabela 1, apresentaram a mesma taxa de hidrólise, 23%, após 12 horas, apesar da concentração de enzima em frasco agitado (350 U/g óleo) ter sido bem superior em relação ao teste realizado em banho agitado (152 U/g óleo), o que ressalta que a quantidade de enzima não seria o principal fator limitante para a taxa de hidrólise. Em ambos os casos, a solubilização não foi boa, ficando uma grande parte da enzima não dissolvida no sistema reacional. Apesar dos problemas de solubilização, as taxas de hidrólise atingiram valores na ordem de 30%, o que demonstra potencial da lipase estudada para realizar a hidrólise do óleo de soja. Na literatura é difícil encontrar relatos a respeito do uso de enzima livre em processos de hidrólise enzimática de óleos vegetais. No entanto para efeito de comparação, o melhor resultado obtido na hidrólise de óleo de peixe utilizando enzima imobilizada e sistema reacional na presença de solvente orgânico foi de 40% [2].

A partir dos resultados dos testes preliminares foram realizados delineamentos experimentais para se avaliar a capacidade hidrolítica do preparado enzimático LS (por ser

o que apresentou melhores resultados na fase preliminar de avaliação), os efeitos da concentração de água, temperatura e agitação sobre o processo.

### 3.2. Estudo da hidrólise enzimática de óleo de soja em frascos agitados.

No primeiro delineamento experimental foram avaliadas as variáveis independentes concentração de lipase (LS), concentração de água e temperatura.

Tabela 3 – Resultados obtidos no primeiro DCCR para hidrólise de óleo de soja com lipase LS após 12 horas.

| Ensaio | LS<br>(U/g óleo) | Água<br>(%m/m) | Temperatura<br>(°C) | Hidrólise<br>(%) |
|--------|------------------|----------------|---------------------|------------------|
| 1      | 200 (-1)         | 10 (-1)        | 34 (-1)             | 6,0              |
| 2      | 500 (+1)         | 10 (-1)        | 34 (-1)             | 35,2             |
| 3      | 200 (-1)         | 20 (+1)        | 34 (-1)             | 14,2             |
| 4      | 500 (+1)         | 20 (+1)        | 34 (-1)             | 32,5             |
| 5      | 200 (-1)         | 10 (-1)        | 40 (+1)             | 19,4             |
| 6      | 500 (+1)         | 10 (-1)        | 40 (+1)             | 18,5             |
| 7      | 200 (-1)         | 20 (+1)        | 40 (+1)             | 15,6             |
| 8      | 500 (+1)         | 20 (+1)        | 40 (+1)             | 27,6             |
| 9      | 98 (-1,68)       | 15 (0)         | 37 (0)              | 30,4             |
| 10     | 602 (+1,68)      | 15 (0)         | 37 (0)              | 28,9             |
| 11     | 350 (0)          | 6,6 (-1,68)    | 37 (0)              | 29,3             |
| 12     | 350 (0)          | 23,4 (+1,68)   | 37 (0)              | 17,0             |
| 13     | 350 (0)          | 15 (0)         | 32 (-1,68)          | 23,7             |
| 14     | 350 (0)          | 15 (0)         | 42 (+1,68)          | 20,0             |
| 15     | 350 (0)          | 15 (0)         | 37 (0)              | 32,0             |
| 16     | 350 (0)          | 15 (0)         | 37 (0)              | 37,0             |
| 17     | 350 (0)          | 15 (0)         | 37 (0)              | 26,4             |

Os resultados obtidos neste delineamento variaram de 6,0 a 37,0% de hidrólise, o que indica a influência dos diferentes tratamentos. Na Tabela 3 observa-se que os resultados mais elevados de hidrólise enzimática foram obtidos nos ensaios 2, 4, 9, 10, 11, 15 e 16, o que contempla quase todas as condições avaliadas para as diferentes variáveis.

Observando-se, por exemplo, o resultado do experimento 9, nota-se uma taxa de hidrólise de 30,4% utilizando 98 U/g óleo (12% m/m) correspondendo ao nível inferior (-1,68), que é muito similar aos resultados dos experimentos 2, 4, 10, 11, 15 e 16 que utilizaram concentrações de enzima bastante superiores. Na comparação com os ensaios preliminares verifica-se situação semelhante. O melhor resultado naquele ensaio foi de 31,3% de hidrólise (Figura 1) utilizando 235 U/g (44% m/m) da enzima, que é praticamente igual a média obtida nos pontos centrais do DCCR, 31,8% de hidrólise utilizando 350 U/g (44 %m/m) da mesma enzima.

Presume-se desta comparação que o aumento na concentração enzimática não promoveu incremento proporcional na taxa de hidrólise. A explicação para este fato está diretamente relacionada com a solubilidade dos preparados enzimáticos no meio reacional, pois concentrações superiores a 5% m/m da enzima não são completamente solúveis no sistema óleo-água, o que leva a uma perda de eficiência no sistema pela baixa homogeneidade.

Com os resultados obtidos no DCCR realizou-se a análise de variância, considerando todos os efeitos. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Análise de Variância (ANOVA) para primeiro DCCR referente à hidrólise do óleo de soja com lipase LS com 12 horas de reação.

| Fonte de variação | SQ      | GL | SQM    | F calculado | F Tabelado* | p-valor |
|-------------------|---------|----|--------|-------------|-------------|---------|
| Regressão         | 773,65  | 4  | 193,41 | 3,63        | 2,48        | 0,04    |
| Resíduo           | 638,74  | 12 | 53,22  |             |             |         |
| Falta de ajuste   | 582,51  | 10 | 58,25  | 2,07        | 9,39        | 0,37    |
| Erro puro         | 56,24   | 2  | 28,12  |             |             |         |
| Total SS          | 1412,39 | 16 |        |             |             |         |

$R^2 = 0,55$ ; \* F com 10% de significância

A análise de variância indicou uma baixa porcentagem dos resultados explicada pelo modelo ( $R^2 = 0,55$ ), o que pode ser percebido pela alta falta de ajuste encontrada. Desta forma não foi possível obter um modelo que fosse estatisticamente significativo e preditivo para descrever o processo hidrolítico, o que está de acordo com a comparação das diferentes condições do DCCR e seus resultados discutidos nos parágrafos anteriores.

No entanto, pode-se observar que a enzima tem uma boa atividade hidrolítica, pois um grande número de ensaios apresentou hidrólise superior a 30%. Resultados como este também haviam sido obtidos com concentrações de enzima mais baixas, o que sugere que a falta de reprodutibilidade e de ajuste dos resultados está mais associada com aos problemas de contato das fases, ou seja, de falta de homogeneização óleo e enzima, do que as concentrações enzimáticas avaliadas no delineamento. De acordo com o discutido aqui, nota-se que é possível reduzir consideravelmente a concentração da enzima, mantendo-se ou mesmo aumentando os níveis de hidrólise do óleo de soja.

Dessa forma, um segundo delineamento experimental foi realizado reduzindo a concentração enzimática e introduzindo a variável agitação. A concentração de água foi reduzida, devido ao fato de um dos efeitos significativos do delineamento anterior ter sido negativo para a concentração de água e ao objetivo inicial de se minimizar a quantidade de água no processo hidrolítico. A temperatura foi fixada em 37°C, pois tanto no delineamento

anterior como em testes preliminares esta variável não demonstrou ter efeito sobre a hidrólise na faixa avaliada. Os ensaios realizados e os resultados obtidos no segundo delineamento estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados do segundo DCCR para hidrólise de óleo de soja com lipase LS após 12 horas.

| Ensaio | LS (U/g<br>óleo) | Água<br>(%m/m) | Agitação<br>(rpm) | Hidrólise<br>experimental<br>(%) | Hidrólise<br>predita<br>(%)* | Desvios<br>relativos<br>(%)** |
|--------|------------------|----------------|-------------------|----------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 1      | 52,5 (-1)        | 7 (-1)         | 90 (-1)           | 29,4                             | 27,9                         | 5,1                           |
| 2      | 87,5 (+1)        | 7 (-1)         | 90 (-1)           | 38,4                             | 32,9                         | 14,3                          |
| 3      | 52,5 (-1)        | 13 (+1)        | 90 (-1)           | 36,9                             | 32,3                         | 12,4                          |
| 4      | 87,5 (+1)        | 13 (+1)        | 90 (-1)           | 41,7                             | 37,3                         | 10,6                          |
| 5      | 52,5 (-1)        | 7 (-1)         | 210 (+1)          | 17,4                             | 20,1                         | 15,5                          |
| 6      | 87,5 (+1)        | 7 (-1)         | 210 (+1)          | 39,1                             | 40,8                         | 4,3                           |
| 7      | 52,5 (-1)        | 13 (+1)        | 210 (+1)          | 21,9                             | 24,4                         | 11,4                          |
| 8      | 87,5 (+1)        | 13 (+1)        | 210 (+1)          | 45,4                             | 45,1                         | 0,7                           |
| 9      | 40 (-1,68)       | 10 (0)         | 150 (0)           | 23,9                             | 25,7                         | 7,5                           |
| 10     | 100 (+1,68)      | 10 (0)         | 150 (0)           | 41,1                             | 47,3                         | 15,0                          |
| 11     | 70 (0)           | 5 (-1,68)      | 150 (0)           | 36,3                             | 32,8                         | 9,6                           |
| 12     | 70 (0)           | 15 (+1,68)     | 150 (0)           | 41,1                             | 40,1                         | 2,4                           |
| 13     | 70 (0)           | 10 (0)         | 50 (-1,68)        | 21,4                             | 25,5                         | 19,2                          |
| 14     | 70 (0)           | 10 (0)         | 250 (+1,68)       | 26,4                             | 25,5                         | 3,4                           |
| 15     | 70 (0)           | 10 (0)         | 150 (0)           | 33,5                             | 36,5                         | 9,0                           |
| 16     | 70 (0)           | 10 (0)         | 150 (0)           | 35,0                             | 36,5                         | 4,3                           |
| 17     | 70 (0)           | 10 (0)         | 150 (0)           | 38,5                             | 36,5                         | 5,2                           |

\* Valores de hidrólise calculados a partir do modelo obtido (Equação 2).

\*\*Desvio relativo = [(hidrólise experimental – hidrólise predita)/hidrólise experimental]/100

Os resultados obtidos neste delineamento foram superiores aos obtidos anteriormente, com redução bastante significativa da quantidade da enzima, demonstrando que uma agitação conveniente e uma melhor solubilização da enzima proporcionaram um ganho considerável de eficiência do sistema reacional.

O valor médio de hidrólise aumentou de 28 para 36% e o valor de  $R^2$  de 0,55 para 0,84, demonstrando que os dados se ajustaram melhor do que no delineamento anterior. A análise dos efeitos mostrou que quatro termos da regressão foram estatisticamente significativos (conforme Equação 2) com  $p < 0,10$  e a partir destas foi realizada a análise de variância (ANOVA) que está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 – Análise de Variância (ANOVA) para segundo DCCR referente à hidrólise do óleo de soja com lipase LS com 12 horas de reação.

| Fonte de variação | SQ      | GL | SQM    | F calculado | F Tabelado* | p-valor    |
|-------------------|---------|----|--------|-------------|-------------|------------|
| Regressão         | 947,80  | 4  | 236,95 | 17,92       | 2,48        | $<10^{-2}$ |
| Resíduo           | 176,92  | 12 | 14,73  |             |             |            |
| Falta de ajuste   | 164,02  | 10 | 16,04  | 2,49        | 9,39        | 0,32       |
| Erro puro         | 12,90   | 2  | 6,45   |             |             |            |
| Total SS          | 1124,72 | 16 |        |             |             |            |

$R^2 = 0,84$ ; \* F com 10% de significância

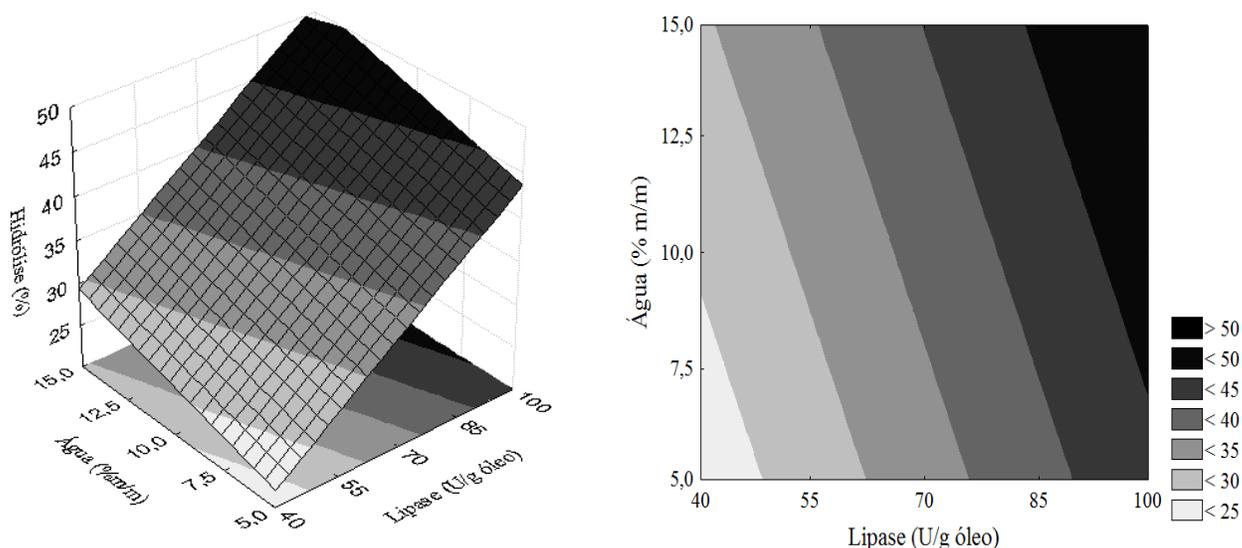
O teste F realizado demonstrou que a regressão analisada foi significativa ( $p < 0,10$ ), sendo o valor calculado de F bastante superior ao valor Tabelado neste nível de significância. O erro puro foi baixo comparado com o valor total da soma de quadrados, o que pode ser evidenciado pelos pontos centrais, cujo valor médio de hidrólise foi de  $(35,7 \pm 2,6)\%$ , o que resulta em um desvio padrão da ordem de 7% em relação ao valor médio. A

partir da ANOVA é possível dizer que o modelo calculado é significativo e preditivo com 90% de confiança, como está mostrado na Equação 2 (codificada).

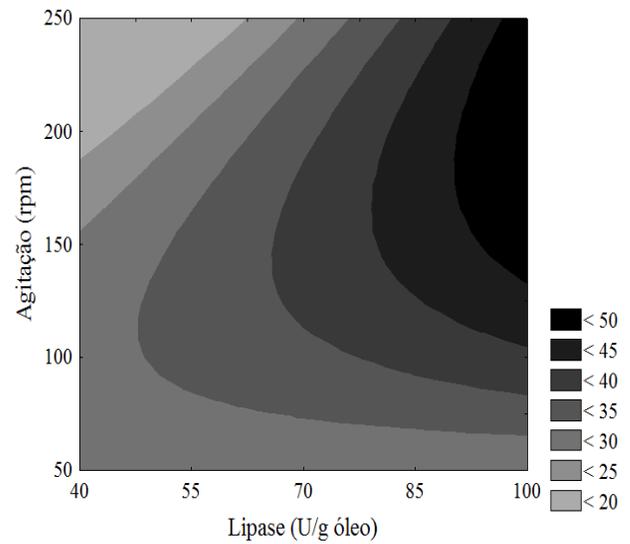
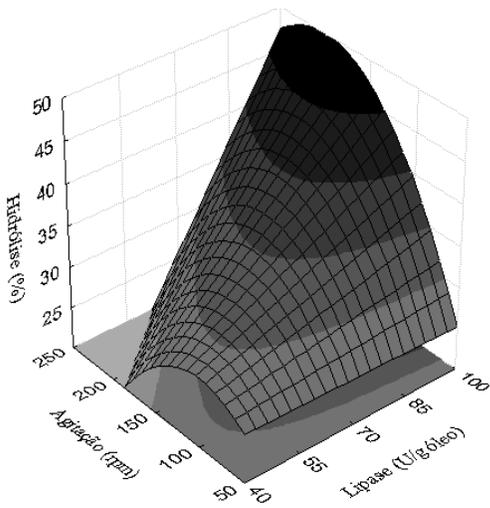
$$\% \text{ hidrólise} = 36,5 + 6,43 LS + 2,16 \text{ Água} - 3,88 \text{ Agitação}^2 + 3,93 LS \cdot \text{Agitação} \text{ (eq.2)}$$

O cálculo dos valores preditos demonstrou que o modelo ajusta-se bem aos dados experimentais, sendo todos os desvios relativos inferiores a 20%, que podem ser considerados satisfatórios, pois a enzima utilizada é apenas parcialmente purificada e com atividade lipolítica inferior às atividades de enzimas comerciais, normalmente citadas na literatura. A utilização de uma enzima parcialmente purificada leva a necessidade de uma porcentagem em massa mais elevada do preparado enzimático, o que compromete a homogeneização do sistema.

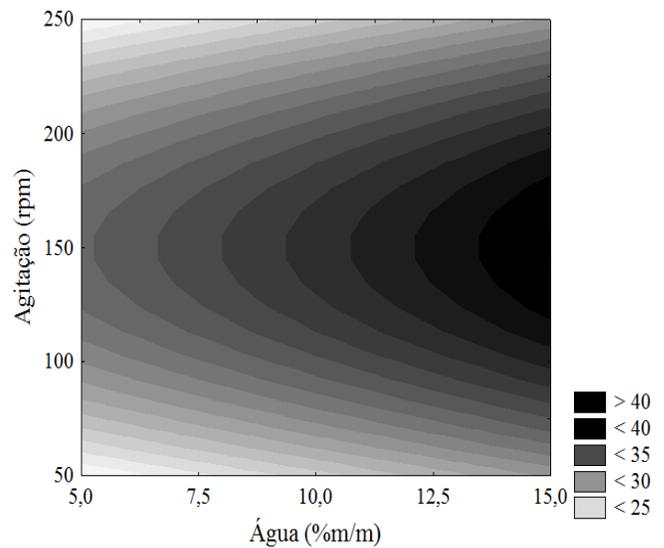
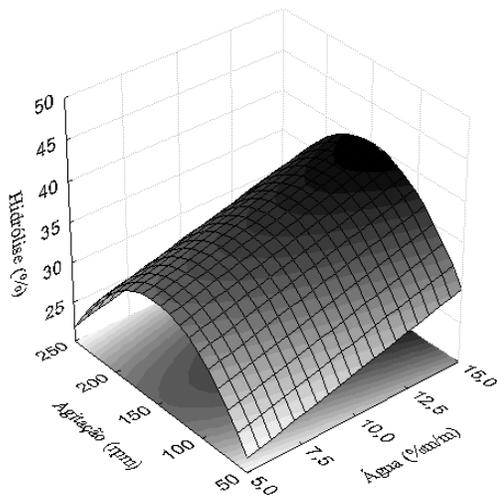
A partir do modelo obtido foram construídas as curvas de contorno que representam o processo avaliado, que estão apresentadas na figura 2.



(a)



(b)



(c)

Figura 2- Superfícies de respostas e curvas de contorno para taxa de hidrólise de óleo de soja por lipase LS em função das variáveis: (a) concentração de LS e água (b) concentração de LS e agitação (c) concentração de água e agitação, com a terceira variável, em cada caso, no nível 0.

Através da análise de superfície de resposta pode-se notar que o aumento da atividade de lipase aumentou a taxa de hidrólise (Figura 2.a e 2.b). Na faixa analisada, condições com concentração enzimática entre 70 e 100 U/g apresentaram taxas de hidrólise superiores a 40% (ensaios 4, 8, 10 e 12), evidenciando que essa faixa de concentração é adequada para se obter um bom nível de hidrólise enzimática, com valores de concentração bastante inferiores aos utilizados no primeiro DCCR.

No entanto, o ensaio 10, que utilizou uma maior quantidade de enzima, não alcançou maiores valores de hidrólise enzimática conforme predito pelo modelo. Nesta condição, a concentração mássica é de 20% m/m da lipase LS no meio reacional, valor este justamente que está na faixa em que se observou uma tendência de queda na taxa de hidrólise durante o ensaio preliminar (Figura 1), devido às dificuldades de solubilização da enzima no meio reacional. Em outras palavras, as concentrações de 70 a 100 U/g estão no limite da solubilidade da enzima, indicando que a concentração da lipase LS acima destes valores não levam a incrementos proporcionais nas taxas de hidrólise.

Outra conclusão que se pode tirar da análise da superfície de resposta foi o efeito positivo da interação entre lipase e agitação (Figura 2.b), o aumento da concentração da lipase associado ao aumento da agitação levou a um incremento na taxa de hidrólise. Em relação à variável concentração de água, em todos os ensaios em que a quantidade de água foi maior, com as demais variáveis fixas, observou-se um incremento na taxa de hidrólise. Isso demonstra que valores de concentração de água entre 13 e 15% seriam os mais indicados dentro da faixa avaliada para obtenção de um nível mais elevado de hidrólise.

Sendo assim pode-se dizer que dentro das condições avaliadas, taxas de hidrólise enzimática superiores a 40% podem ser obtidas utilizando-se a lipase LS com concentração entre 70 e 100 U/g, concentração de água entre 13 e 15% m/m e agitação por volta de 200 rpm. No entanto, a faixa de concentração enzimática que levou aos melhores resultados neste delineamento ainda utiliza uma concentração em massa bastante elevada, não solucionando completamente os problemas de homogeneização da enzima no meio reacional. Sendo assim, na sequência dos trabalhos a concentração enzimática foi

reavaliada a fim de se obter melhores resultados, bem como alterações na temperatura e no tipo de sistema reacional.

### 3.3. Estudo da influência da temperatura na hidrólise enzimática de óleo de soja em frascos agitados

Após a realização do segundo delineamento experimental, realizou-se um estudo para avaliar o efeito da temperatura sobre o processo hidrolítico. Por sugestão de pesquisadores da área de óleos vegetais, avaliou-se a hidrólise na faixa entre 37 e 70°C. Processos enzimáticos normalmente são limitados pela temperatura, devido aos processos de desnaturação enzimática, no entanto, a maioria dos processos envolvendo óleos vegetais é realizada em temperaturas mais elevadas, o que facilita a reação dos mesmos. Tentando conjugar estas duas situações divergentes, escolheu-se a faixa acima para avaliar o processo hidrolítico enzimático, a fim de melhorar as taxas de hidrólise obtidas. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 3.

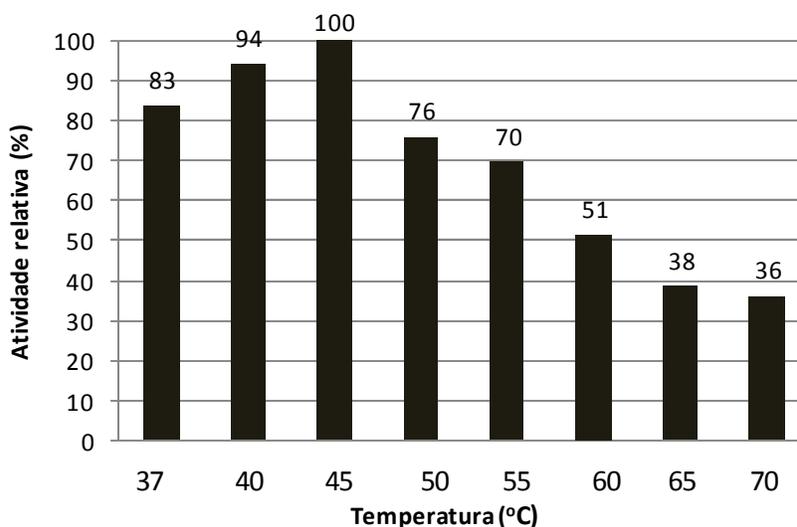


Figura 3 – Efeito da temperatura sobre a hidrólise enzimática do óleo de soja por lipase LS (100 U/g óleo; 20% m/m), com 13% m/m de água, 210 rpm em frascos agitados e 12 horas de reação.

A Figura 3 mostra que a temperatura superior a 37°C provoca um incremento na hidrólise enzimática do óleo de soja (nas condições de 100 U/g óleo equivalente a 20% m/m, 13% m/m de água e 210 rpm de agitação) até 45°C. Acima desse valor, observa-se uma progressiva diminuição da taxa de hidrólise, provavelmente em função da desnaturação enzimática, uma vez que a enzima utilizada é proveniente do microorganismo *Geotrichum candidum* NRRLY-552, que em sua forma bruta tem temperatura ótima na faixa entre 37 e 47°C [3, 4]. Apesar da melhor condição apresentada a 45° C, observa-se que a enzima preserva 70% da atividade enzimática a 55° C, o que pode ser um dado bastante interessante para futuras aplicações industriais que necessitem de temperaturas mais elevadas.

A partir desses resultados, a temperatura dos ensaios seguintes foi alterada de 37 para 45°C a fim de se obter um incremento na taxa de hidrólise. Neste experimento, no entanto, as taxas de hidrólise foram relativamente baixas, atingindo no máximo 20% a 45°C, o que pode ser atribuído a alta concentração de enzima utilizada (20% m/m), o que levou novamente a problemas de homogeneização. Decidiu-se para o próximo experimento avaliar a influência da concentração (em massa) do preparado enzimático sobre a taxa de hidrólise na nova condição de temperatura.

#### **3.4. Estudo da influência da concentração enzimática na hidrólise enzimática de óleo de soja em frascos agitados**

O primeiro experimento para avaliar a influência da concentração enzimática utilizou uma faixa de concentração entre 1,0 e 20% m/m da lipase LS. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.

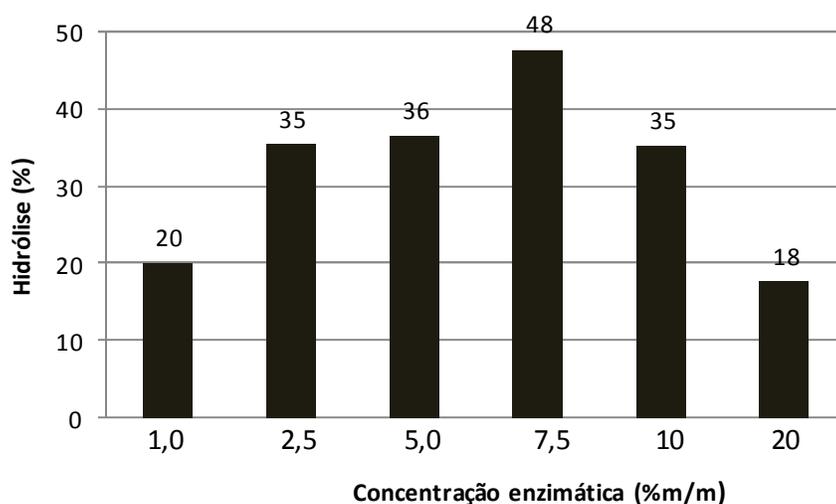


Figura 4 – Efeito da concentração enzimática sobre a hidrólise do óleo de soja por lipase LS, com 15% m/m de água, 45°C, 210 rpm em frascos agitados e 12 horas de reação.

Os resultados apresentados na Figura 4 demonstraram que, na faixa entre 2,5 e 7,5% m/m de enzima LS (atividade entre 11,0 e 33,0 U/ g óleo), os resultados de hidrólise foram similares aos resultados obtidos nos delineamentos experimentais. Este resultado vem confirmar a tese de que a solubilização da enzima no meio reacional é fundamental para o bom desempenho da reação hidrolítica.

O que se observa a partir dos resultados do experimento mostrado na Figura 4 é que a diminuição da concentração enzimática favoreceu a solubilização da enzima, promovendo uma maior taxa de hidrólise, sendo a faixa de concentração entre 2,5 e 7,5% m/m (ou 11 a 33 U/g óleo) suficiente para promover a hidrólise de forma adequada. Na comparação do melhor resultado deste experimento (48% de hidrólise com 33 U/g óleo) com o do segundo delineamento experimental (45,4% de hidrólise com 87,5 U/g óleo) nota-se que se obteve praticamente o mesmo percentual de hidrólise com uma redução de 2,5 vezes na atividade enzimática e na concentração em massa do preparado enzimático. Trabalhos na literatura citam condições ótimas para reações envolvendo óleos vegetais na faixa de 5% m/m de concentração enzimática [5, 6].

No entanto, é preciso salientar que a diminuição da concentração enzimática sem prejuízo das taxas de hidrólise neste experimento está associada ao aumento da temperatura. Na comparação com o segundo DCCR, nota-se que as taxas de hidrólise enzimática com concentrações enzimática entre 40 e 50 U/g óleo apresentaram resultados bastante inferiores (por volta de 20% de hidrólise) comparadas a condição de 33 U/g óleo desse experimento (48% de hidrólise), o que pode ser atribuído ao aumento na temperatura de processo.

Um segundo experimento foi realizado para confirmar os resultados obtidos. As condições de 2,5; 5,0 e 7,5% m/m da lipase LS foram avaliadas (11 a 33 U/g óleo). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5. Estendeu-se o tempo de análise da hidrólise enzimática até 24 horas de processo.

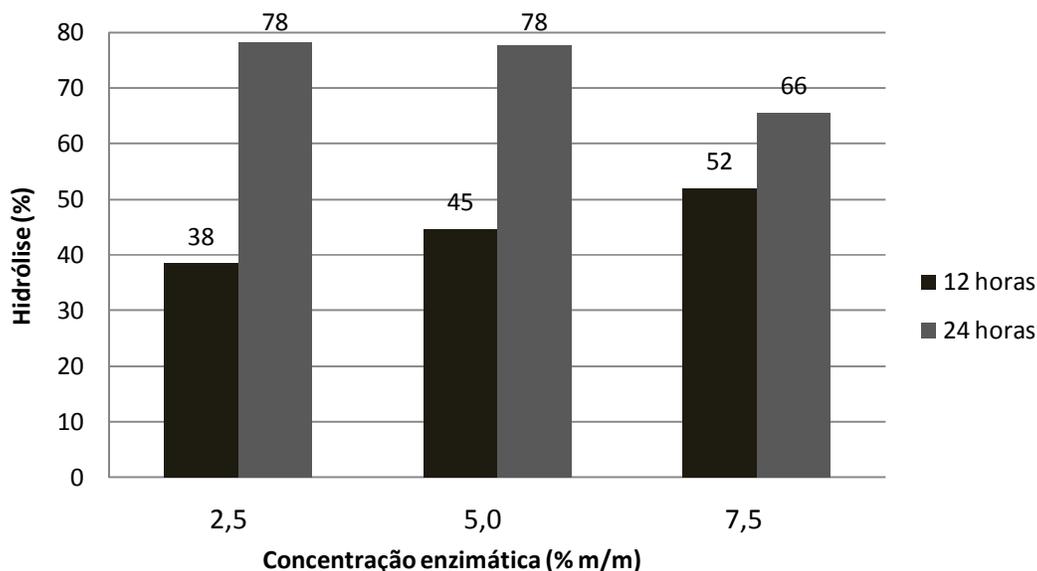


Figura 5 – Efeito da concentração enzimática sobre a hidrólise do óleo de soja por lipase LS, com 15% m/m de água, 45°C, 210 rpm em frascos agitados.

Na Figura 5 observa-se que após 12 horas, a amostra com 7,5% m/m de enzima apresentou maior taxa de hidrólise (52%), o que era esperado, uma vez que o aumento da concentração enzimática tende a aumentar a velocidade de reação. No entanto, após 24 horas, a hidrólise na amostra com 7,5% m/m é inferior aos resultados das amostras com concentrações inferiores (2,5 e 5,0% m/m). Neste caso, deve-se levar em conta que a enzima utilizada é capaz de reverter a reação de hidrólise, promovendo novamente a esterificação dos ácidos graxos formados. Como na condição com 7,5% m/m, a concentração é mais elevada, pode-se supor que o máximo de hidrólise tenha sido atingido em um tempo inferior a 24 horas, sendo que no segundo tempo avaliado a taxa de hidrólise já estivesse em declínio, comparado com as condições 1 e 2.

Nota-se também que as taxas de hidrólise foram bastante altas em todas as concentrações avaliadas. A escolha de uma das três condições deve se dar levando em conta o ganho de hidrólise em função do tempo. Nas condições 1 e 2, obteve-se por volta de 78% de hidrólise após 24 horas, o que leva a uma produtividade de 3,25% hidrólise/h. Por outro lado, na condição 3, a taxa máxima de hidrólise foi de 52% após 12 horas, o que resulta em uma produtividade maior, na ordem de 4,33% hidrólise/h.

A condição de concentração enzimática de 5% m/m foi escolhida para avaliação da cinética do processo de hidrólise ao longo do tempo e para verificar a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

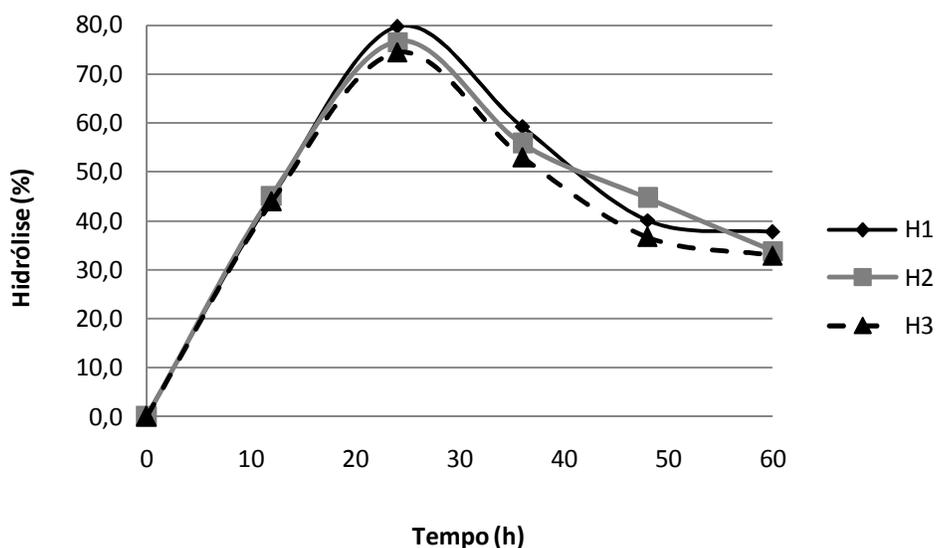


Figura 6 – Cinética do processo de hidrólise enzimática de óleo de soja utilizando lipase LS na concentração de 5% m/m (22 U/g óleo), com 15% m/m de água, 45°C, 210 rpm em frascos agitados.

Na Figura 6 é possível observar o comportamento do processo hidrolítico ao longo do tempo até 60 horas de processo. Os ensaios H1, H2 e H3 utilizaram as mesmas condições reacionais e pode-se confirmar que o máximo de hidrólise foi obtido após 24 horas de hidrólise com  $(77 \pm 3)\%$ . Após este tempo de reação há uma diminuição na concentração de ácidos graxos livres no meio reacional até 60 horas de processo. A razão para esta diminuição encontra-se no fato de que a hidrólise de triacilgliceróis a ácidos graxos livres e glicerol ser um processo reversível. Parte dos triacilgliceróis hidrolisados no início da reação voltam a formar triacilgliceróis após longo tempo de reação. Após 60 horas de processo, obteve-se  $(35 \pm 3)\%$  de hidrólise residual, mostrando que cerca de 50% dos ácidos graxos formados no início da reação voltam a formar triacilgliceróis. Os dados apresentados indicam que, nas condições utilizadas, a condição de equilíbrio entre triacilgliceróis e ácidos graxos livres situa-se na faixa entre 35 e 40% de ácidos graxos livres. Os resultados obtidos apresentam um desvio padrão baixo, evidenciando uma boa reprodutibilidade do processo.

Ao final dos experimentos realizados nesta etapa, pode-se dizer que a faixa de concentração de lipase LS entre 2,5 e 7,5% m/m (equivalente a 11 a 33 U/ g óleo) apresentou as melhores condições para realização da hidrólise enzimática do óleo de soja, com a utilização de 13 a 15% m/m de água, temperatura de 45°C, 210 rpm em frascos agitados. Na condição de 5% m/m de concentração enzimática obteve (44,6 ± 0,6)% e (77 ± 3)% de hidrólise após 12 e 24 horas, respectivamente.

Esses resultados podem ser considerados muito bons considerando-se a utilização de uma enzima parcialmente purificada e baixas concentrações de água. Obteve-se 88% na hidrólise do óleo de soja após 5 horas de reação, mas com enzima comercial com alto grau de pureza (> 10.000 U/g) [7]. Em outro estudo obteve-se 90% de hidrólise utilizando 100U/g de óleo após 24 horas, no entanto com 40% m/m de água. Na ausência de água, tais autores obtiveram apenas 47% de hidrólise após 24 horas [8]. Enquanto isso foi obtido um incremento de 12 para 40% da hidrólise de óleo de peixe, porém com uso de enzima imobilizada e sistema contendo solvente orgânico, que tende a proteger a enzima, reduzindo a perda da atividade enzimática durante o processo [2]. Por sua vez, em outros trabalhos, obteve-se 60% de hidrólise de óleo de salmão após 24 horas, utilizando alta concentração enzimática (500 U/g óleo da lipase de *Aspergillus niger*) e razão molar água:óleo de 2:1 (cerca de 4% m/m), na mesma temperatura (45°C) [9] e alcançou-se 50,5% de ácidos graxos livres poliinsaturados também na hidrólise do óleo de salmão após dois ciclos de reação [10]. Além disso, níveis de hidrólise da ordem de 80%, obtidos neste trabalho após 24 horas de hidrólise, são compatíveis com a necessidade de se ter um hidrolisado com alto teor de ácidos graxos livres para promover a esterificação para obtenção de alquil ésteres de ácidos graxos (biodiesel).

### **3.5. Estudo da hidrólise enzimática de diferentes óleos vegetais em frascos agitados**

Com as condições de hidrólise estabelecidas previamente para o óleo de soja, realizou-se um experimento para avaliar a ação da lipase LS na hidrólise de outros óleos

vegetais. Os resultados obtidos após 12 e 24 horas de hidrólise enzimática com os óleos de soja, oliva, girassol, canola e milho estão mostrados na Figura 7.

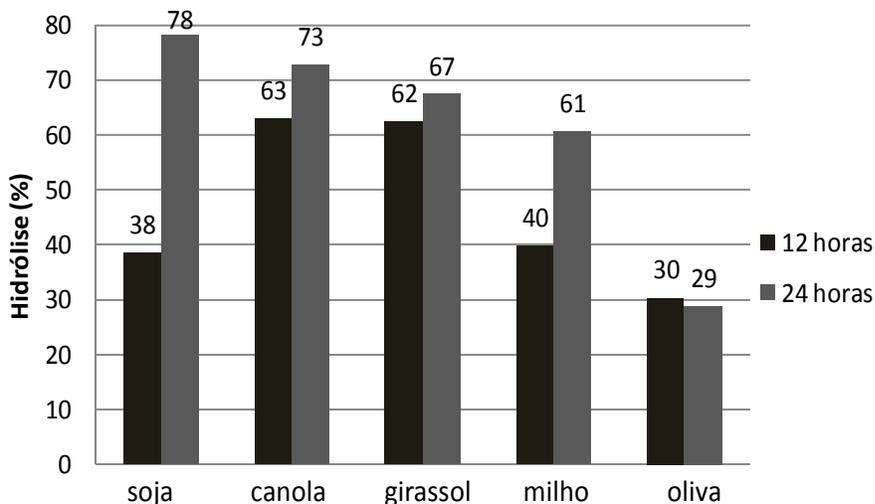


Figura 7 – Hidrólise enzimática de diferentes óleos vegetais com 5,0% m/m (22 U/g óleo) de lipase LS, 15% m/m de água, 45°C, 210 rpm em frascos agitados.

Comparativamente, a hidrólise do óleo de soja foi similar ao experimento anterior (Figura 6), obtendo-se um máximo de 78% de hidrólise após 24 horas de processo, confirmando que a enzima tem uma boa ação hidrolítica sobre o óleo de soja dentro nas condições selecionadas. Em relação aos demais óleos, a Figura 7 mostra que a enzima utilizada apresentou um alto grau de hidrólise também para os outros óleos vegetais analisados, exceto para o de oliva. Os resultados são preliminares, mas é um bom indicativo de que a enzima consegue atuar bem sobre diferentes óleos vegetais, o que é interessante do ponto de vista de aplicação desta em processo industrial. Nota-se também que a hidrólise apresentou maior velocidade para óleos de canola e girassol, superando 60% de conversão nas primeiras 12 horas de processo, frente a resultados inferiores para os demais óleos. Este resultado é muito interessante quando se pensa em reduzir os tempos de reação na etapa preliminar para obtenção do biodiesel.

### 3.6. Estudo da hidrólise enzimática de óleo de soja em reatores encamisados

Os resultados obtidos nos ensaios em reator com agitação magnética estão apresentados na Figura 8.

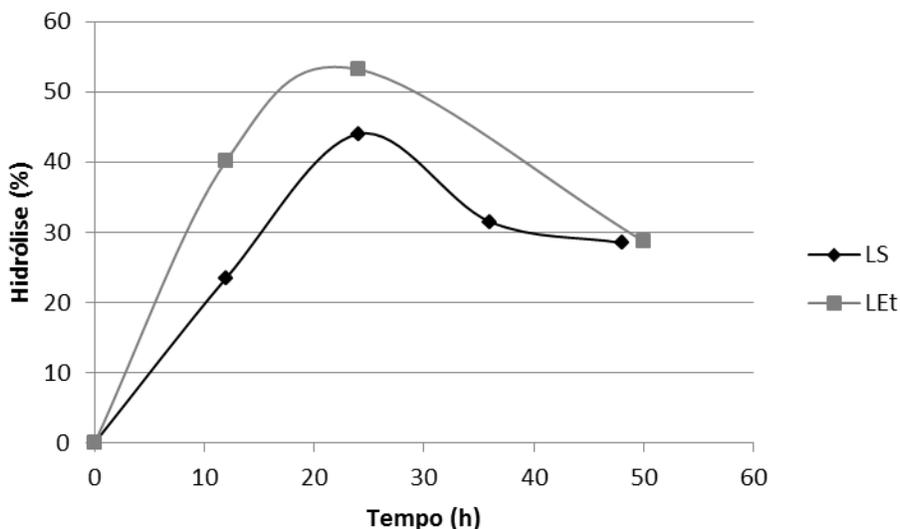


Figura 8 – Perfil de hidrólise enzimática de óleo de soja em reator encamisado com agitação magnética com lipases LS (10% m/m; 64 U/g óleo) e LEt (5% m/m; 46 U/g óleo), 15% m/m de água e 37°C.

A Figura 8 mostra um melhor desempenho no ensaio realizado com lipase LEt. Ao longo dos estudos, não houve diferença significativa nas enzimas LS e LEt quando submetidas as mesmas condições de reação e com atividade enzimática próximas. A principal diferença nos resultados mostrados na Figura 8 provavelmente está relacionada com a concentração enzimática, no ensaio com a enzima LS utilizou-se 10% m/m enquanto que no ensaio com a enzima LEt esta concentração foi de 5% m/m, valor este compatível com a faixa que apresentou melhores resultados nos ensaios em frascos agitados. No ensaio com a enzima LS houve problemas com a agitação magnética devido à solubilização parcial da enzima no sistema óleo-água.

Observa-se também um perfil semelhante ao que foi obtido em frascos agitados, com o máximo de hidrólise ocorrendo após 24 horas, mas com uma produtividade maior em 12 horas, ou seja, a maior parte da hidrólise ocorre até 12 horas de processo, mas ela continua ocorrendo até 24 horas de processo. No ensaio com a enzima LS é possível notar que após 36 horas já há uma diminuição da concentração de ácidos graxos livres, o que evidencia a reversão da hidrólise, mesma situação verificada nos experimentos em frascos agitados (Figura 6). Pensando em aplicar o hidrolisado obtido para produção de biodiesel, a hidrólise deveria ser interrompida antes deste tempo para diminuir os efeitos da reversão da reação de hidrólise, que leva a redução na concentração dos ácidos graxos livres.

Os resultados obtidos foram inferiores aos conseguidos em frascos agitados, porém nos experimentos em reator ainda utilizou-se a temperatura de 37°C, enquanto que para frascos agitados a temperatura foi elevada para 45°C. O aumento da temperatura para os reator encamisado provavelmente levaria a taxas de hidrólise da mesma ordem de grandeza das obtidas em frascos agitados.

#### **4. CONCLUSÃO**

Os experimentos realizados apontaram que a lipase parcialmente purificada de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 apresenta uma boa ação hidrolítica sobre diferentes óleos vegetais (soja, milho, canola e girassol), utilizando-se uma baixa concentração enzimática e um sistema com concentração aquosa relativamente baixa. Na condição experimental de 5% m/m (22 U/ g óleo), 15% m/m de água, temperatura de 45° C e agitação de 210 rpm foram alcançados os melhores resultados, com taxa de hidrólise do óleo de soja de  $(77 \pm 3)\%$ , após 24 horas de reação. A taxa de hidrólise obtida é bastante boa comparada com relatos apresentados na literatura e mostra-se adequada para utilização do hidrolisado para a obtenção de biodiesel a partir do processo de esterificação enzimática. Também foi possível ao longo dos experimentos resolver os problemas de homogeneização do sistema água:óleo:enzima, pela redução da concentração da enzima. Verificou-se ainda que a hidrólise pode ser realizada em diferentes sistemas reacionais com resultados na

mesma ordem de grandeza quando se utilizam condições reacionais similares, o que indica a possibilidade da utilização desse processo para diferentes sistemas reacionais.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Qin H, Yan X, Yun T, Dong W (2008) Biodiesel Production Catalyzed by Whole-Cell Lipase from *Rhizopus chinensis*. *Chinese Journal of Catalysis* 29(1):41-46.
2. Yan J, Liu S, Hu J, Gui X, Wang G, Yan Y (2011) Enzymatic enrichment of polyunsaturated fatty acids using novel lipase preparations modified by combination of immobilization and fish oil treatment. *Bioresource Technology* 102(14):7154-7158.
3. Burkert JFM, Maldonado RR, Maugeri F, Rodrigues MI (2002) Caracterização bioquímica da lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552. Caderno de Resumos do *IV Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos* 1:162.
4. Maldonado RR, Pozza EL, Maugeri F, Rodrigues MI (2005) Determinação da temperatura e pH ótimos das lipases bruta e purificada de *Geotrichum candidum* obtidas com diferentes fontes de nitrogênio. Anais do XV Simpósio Nacional de Fermentações 1:120.
5. Charpe T, Rathod VK (2011) Biodiesel production using waste frying oil. *Waste Management* 31(1):85-90.
6. Vieira APA, Silva MAP, Langone MAP (2002) Biodiesel production via esterification reactions catalyzed by lipase. 2<sup>nd</sup> Mercosul Congress on Chemical Engineering. 4<sup>th</sup> Mercosul Congress on Process Systems Engineering.
7. Ting WJ, Huang CM, Giridhar N, Wu WT (2008) An enzymatic/acid-catalyzed hybrid process for biodiesel production from soybean oil. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers* 39(3):203-210.

8. Watanabe Y, Nagao T, Nishida Y, Takagi Y, Shimada Y (2007) Enzymatic Production of Fatty Acid Methyl Esters by Hydrolysis of Acid Oil Followed by Esterification. *Journal American of Oil Chemical Society* 84:1015-1021.
9. Carvalho PO, Campos PRB, Noffs MD, Fregolente PBL, Fregolente L (2009) Enzymatic hydrolysis of salmon oil by native lipases: Optimization of process parameters. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 20(1):117-124.
10. Kahveci D, Xu X (2011) Repeated hydrolysis process in effective for enrichment of omega-3 polyunsaturated fatty acids in salmon oil by *Candida rugosa* lipase. *Food Chemistry* 129(4):1552-1558.

**CAPÍTULO VI – ESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA**  
**DE ÓLEO DE SOJA UTILIZANDO LIPASE DE *Geotrichum candidum***

**Esterification and transesterification reactions of vegetable oils  
catalysis by lipase from *Geotrichum candidum* NRRLY-552.**

Rafael Resende Maldonado<sup>7a</sup>, Felipe Masiero Fogaça<sup>a</sup>, Gabriela Alves Macedo<sup>b</sup>, Marcio A.  
Mazutti<sup>c</sup> and Maria Isabel Rodrigues<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Food Engineering, University of Campinas, P.O. Box 6121, Campinas -  
SP, 13083-862 – Brazil

<sup>b</sup> Department of Food Science, University of Campinas, P.O. Box 6121, Campinas - SP,  
13083-862 – Brazil

<sup>c</sup> Department of Chemical Engineering - Federal University of Santa Maria, Av. Roraima,  
1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

**Artigo elaborado para submissão para revista**

***Brazilian Journal of Chemical Engineering***

---

<sup>7</sup> Rafael R. Maldonado, Department of Food Engineering, University of Campinas, P.O. Box 6121, Campinas - SP, 13083-862 – Brazil. Fax: +551935214027. E-mail: ratafta@yahoo.com.br

## ABSTRACT

This work evaluated esterification and transesterification of soybean oil with ethanol using pre-purification lipase from *Geotrichum candidum* NRRLY-552 in shaken flasks. Results show that this lipase was very efficient to hydrolysis vegetable oils but did not have good action to esterification. The maximum esterification was 2.0% of ethyl ester of soybean oil. However it was verified that lipase analyzed has certain specificity to produced ethyl ester of linoleic acid that increases 10 times after 60 hours (12 hours of hydrolysis and 48 hours of esterification) using 5.0% w/w of lipase; 15% w/w of water, 45°C, 210 rpm and molar ratio (oil: ethanol) of 1:5 in shaken flasks. The results suggested that it is possible to use lipase from *Geotrichum candidum* to hydrolysis soybean oil but it is necessary to select other lipase to esterification or other experimental conditions to obtain high level of ethyl ester of soybean oil in this system.

*Key words: lipase; hydrolysis, vegetable oils, esterification, transesterification, biodiesel*

## 1. INTRODUÇÃO

A obtenção de biodiesel por via enzimática pode ser realizada tanto por transesterificação de óleos vegetais com reagente alcoólico como pela hidrólise dos óleos vegetais seguida da esterificação dos ácidos graxos livres gerado com reagente alcoólico. Muitos trabalhos são relatados na literatura com as mais variadas condições reacionais, mas alguns aspectos mais relevantes merecem destaque em relação a este processo.

A utilização de material oleaginoso com alto teor de ácidos graxos livres, como foi o foco deste trabalho, é pouco viável quando se utiliza a catálise alcalina tradicional, uma vez que o meio alcalino leva a saponificação dos ácidos graxos livres comprometendo a obtenção dos ésteres de ácidos graxos de cadeia curta (biodiesel). Desta forma, a utilização de inúmeras matérias-primas brutas e resíduos agro-industriais, que contém quantidade significativa de ácidos graxos livres é dificultada no processo tradicional de catálise. No entanto, a catálise enzimática é capaz de converter tais substratos em biodiesel sem o inconveniente da produção de sabão no processo.

Raita et al. (2011) fazem uso de um sistema com lipase imobilizada associada a um aminoácido (glicina) para realizar a esterificação de ácidos graxos livres proveniente do óleo de palma (óleo com alto grau de acidez) como alternativa a catálise alcalina, obtendo um rendimento de 87% na conversão em termos de éter etílico de ácido palmítico em um sistema utilizando 20% m/m de enzima, razão molar 1:4 (ácidos graxos livres: etanol), temperatura de 50°C com 6 horas de reação. Em outro trabalho, Wang e Cae (2011) avaliaram o dietil acetato como reagente para obtenção de ésteres etílicos provenientes dos ácidos graxos livres do óleo de camellia obtendo 83,9% de éster etílico de ácido oléico a partir de uma razão molar 3:1 (dietil carbonato: óleo), 5% m/m de lipase Novozyme 435, a 50°C, 180 rpm por 24 horas.

A transesterificação enzimática é, por outro lado, amplamente estudada, no entanto há um número considerável de trabalhos com a utilização de enzimas comerciais de alto grau de pureza (que apresentam custo elevado), uso do metanol como reagente alcoólico (álcool normalmente obtido a partir do petróleo) e sistemas com quantidade de água

praticamente nula (o que leva a necessidade de processos de remoção de umidade das matérias-primas para realização da reação). Outro fator importante é a desnaturação enzimática provocada pela alta concentração do reagente alcoólico no meio reacional, o que é necessário para o deslocamento do equilíbrio no sentido da formação dos ésteres etílicos. No entanto é possível notar esforços para superar tais dificuldades e ampliar as possibilidades de obtenção de biodiesel pelas mais variadas matérias-primas e sistemas reacionais.

Watanabe et al. (1999) avaliaram a estabilidade da lipase imobilizada de *Candida antarctica* e observaram que esta era inativada por uma quantidade de etanol na razão molar 1:23 (óleo:etanol) e avaliaram a produção de ésteres etílicos do óleo de atum com um sistema com adição fracionada de etanol como forma de reduzir a inibição da ação enzimática. Para um sistema com adição de etanol na razão molar 1:13, a 40°C e 4% m/m de enzima obteve-se 33% de conversão após 10 horas de reação. Já para um sistema de adição fracionada, com a adição de etanol na razão de 1:13 nos tempos 0, 12 e 24 horas atingiu-se uma conversão de 95% após 48 horas de reação, nas mesmas condições. Em outro trabalho, Lee et al. (2011) utilizaram sílica gel como absorvedor do excesso de metanol utilizado na transesterificação do óleo de canola em sistema livre de solvente orgânico e observaram que houve uma aumento no rendimento do processo na presença da sílica gel comparado ao sistema em que o metanol ficou diretamente em contato com a enzima.

Diferentes tipos de alcoóis foram avaliados para a produção de biodiesel por Giraldo e Moreno-Piraján (2012), que avaliaram a produção do biocombustível utilizando lipase imobilizada em espuma de nonilfenol etoxilado com óleo de *Persea americana mill oil* (Aguacate) com os alcoóis metanol, etanol, propanol, 2,2-dimetilpropanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol. O melhor resultado foi obtido com o 3-metil-1-butanol em que a conversão variou de 70 a 100% de acordo com a condição experimental, enquanto etanol variou de 45 a 60% e metanol de 37 a 48%. Este trabalho é interessante por demonstrar uma condição reacional na qual alcoóis de cadeia carbônica mais longa apresentam resultados melhores do que o metanol, amplamente citado na literatura.

A utilização de enzimas não comerciais foi avaliada por Andrade et al. (2012) que utilizando células imobilizadas de diferentes fungos para realizar a etanolise do óleo de babaçu, obtendo melhor resultado com *Mucor circinelloides* URM4182 com 83% de conversão. Em outro trabalho, Hama et al. (2007) atingiram 90% de rendimento na produção de biodiesel com células imobilizadas de *Rhizopus oryzae* a partir de óleo de soja e metanol. A grande maioria dos trabalhos relatados utilizam células ou enzimas imobilizadas para a produção de biodiesel, no entanto é possível encontrar relatos do uso de enzima livre, Al-Zuhair et al. (2008) alcançaram 90% de rendimento na produção de biodiesel a partir do hidrolisado do óleo de palma com lipase livre de *Candida rugosa*.

A presença de água é geralmente um fator limitante para os processos de transesterificação e esterificação, no entanto Al-Zhuair et al. (2006) conseguiram realizar a esterificação de ácido butírico com metanol catalisada pela lipase de *Mucor mieher*, em sistema com solvente orgânico (n-hexano) em sistema bifásico utilizando água até a concentração de 25% v/v sem que houvesse inibição da reação.

Em outros casos, quando se faz a obtenção de ésteres etílicos em dois estágios (hidrólise + esterificação) é comum haver a necessidade de se associar mais de uma enzima na catálise do sistema, uma com maior ação hidrolítica e outra com maior eficiência de esterificação, uma vez que uma mesma enzima pode não apresentar boa ação em ambas as reações. É o que se observa no trabalho de Rodrigues e Ayub (2011) que utilizaram catálise enzimática com lipases imobilizadas de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e *Rhizomucor miehei* (RML) para realizar hidrólise e transesterificação do óleo de soja. A condição ótima para hidrólise foi razão molar 3:1 (água:óleo), 25% m/m da lipase imobilizada contendo 65% da lipase de TLL, atingindo-se 95% de hidrólise. Já para a transesterificação, a condição ótima contou com razão molar 7,5:1 (etanol:óleo) e 25% m/m da lipase imobilizada contendo 80% da lipase de TLL, alcançando 90% de conversão.

A partir dos resultados para hidrólise dos óleos vegetais, realizou-se a avaliação da capacidade da lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 em realizar a esterificação dos ácidos graxos livres obtidos. O hidrolisado obtido foi esterificado utilizando etanol para

obtenção de ésteres etílicos de ácidos graxos. Avaliou-se também a transesterificação do óleo de soja com etanol com intuito de obterem-se ésteres etílicos de ácidos graxos para utilização como biodiesel.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Esterificação de ácidos graxos livres com etanol**

O primeiro ensaio de esterificação avaliou a influência da concentração de lipase LS sobre o processo reacional. A etapa prévia de hidrólise do óleo de soja foi realizada variando a concentração de lipase LS entre 2,5 e 7,5% m/m (equivalente a faixa de 11 a 33 U/g de óleo), com as seguintes condições reacionais: 5,0 g de óleo de soja (marca Soya), 0,75 g de água (15% m/m), agitação de 210 rpm e temperatura de 45°C em frascos agitados. Após 24 horas de hidrólise, iniciou-se a etapa de esterificação com a adição de etanol ao meio reacional. Utilizou-se etanol na razão molar de 1:5 (óleo: etanol), sendo esta quantidade adicionada de forma fracionada, em três etapas (24, 36 e 48 horas de processo total). A adição fracionada de etanol é uma forma de reduzir a inativação enzimática pelo contato da enzima com o álcool e é utilizada em vários trabalhos citados na literatura, como por exemplo, Watanabe et al, (1999); Shimada et al. (2002) e Qin et al. (2008).

Um sistema nas mesmas condições, porém com apenas 12 horas de hidrólise prévia também foi avaliado, utilizando-se 5% m/m (22 U/g óleo) de lipase LS, para efeito de comparação. Avaliou-se a concentração de ácidos graxos livres por método titulométrico e a presença de ácidos graxos livres e ésteres foram avaliados em cromatografia de camada delgada.

A partir dos resultados obtidos no primeiro ensaio, realizou-se um segundo experimento com 5% m/m de lipase LS e hidrólise prévia de 12 horas nas mesmas condições reacionais acima, variando-se a concentração de etanol. Foram avaliadas as razões molares 1:5 e 1: 10 (óleo:etanol). Avaliou-se a concentração de ácidos graxos livres por método titulométrico e a presença de ácidos graxos livres e ésteres foram avaliados por cromatografia gasosa.

## **2.2. Transesterificação de óleo de soja com etanol**

A transesterificação do óleo soja com etanol foi avaliada nas condições reacionais descritas acima - concentração de lipase LS entre 2,5 e 7,5% m/m (equivalente a faixa de 11 a 33 U/g de óleo), 5,0 g de óleo de soja (marca Soya), 0,75 g de água (15% m/m), agitação de 210 rpm e temperatura de 45°C em frascos agitados. A adição de etanol na razão molar de 1:5 foi feita de forma fracionada nos tempos 0, 12 e 24 horas de processo total. Avaliou-se a concentração de ácidos graxos livres por método titulométrico e a presença de ácidos graxos livres e ésteres foram avaliados em cromatografia de camada delgada.

## **2.3. Métodos cromatográficos para identificação de ácidos graxos livres e ésteres**

### **2.3.1. Cromatografia em camada delgada**

A avaliação qualitativa da presença de ácidos graxos livres e ésteres nas amostras submetidas a esterificação e transesterificação foram realizadas por cromatografia em camada delgada. As amostras foram aplicadas em placa TLC Silica Gel 60 20 x 20 cm (Merck) junto com padrões de ácido oléico e oleato de etila (Padrão Sigma mínimo 99%) e com amostra do óleo de soja utilizado nas reações.

A fase móvel foi preparada com 210 mL de éter de petróleo, 90 mL de éter etílico e 0,4 mL de ácido fórmico. As placas com as amostras foi colocada em contato com a fase móvel em cuba cromatográfica e deixou-se a frente móvel correr até a altura de 10 cm em relação ao ponto de aplicação. Ao término da corrida, as placas foram reveladas utilizando mistura de 5% de ácido sulfúrico em etanol, seguida de secagem em estufa a 80°C por dois a três minutos. Compararam-se as manchas obtidas pelas amostras com as dos padrões (Zheng e Hanna, 1996).

### **2.3.2. Cromatografia gasosa**

Amostras do último experimento de esterificação foram analisadas por cromatografia gasosa para identificação de ácidos graxos e ésteres, baseado no método utilizado por Su e Wei (2008). Para preparo das amostras, pesou-se massa de amostras equivalente a 50 µL em eppendorf, adicionou-se 100 µL de hexano e realizou-se a homogeneização com agitação em vórtex. Em seguida adicionou-se sulfato de sódio anidro seguido de nova homogeneização. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm e recolheu-se o sobrenadante em outro eppendorf, repetindo-se o procedimento mais uma vez. Após isso, a amostra obtida foi seca em corrente de nitrogênio e ressuspensa em 100 µL de hexano.

Após preparo, as amostras foram injetadas em cromatógrafo gasoso GC/MS-QP20105 Shimadzu, acoplado a espectrômetro de massa. A análise foi realizada com temperatura do injetor em 220°C e temperatura do detector de 250°C. A rampa de aquecimento foi feita a partir de 120°C por 2 minutos, seguida de aquecimento a taxa de 10°C/minuto até 180°C, mantendo-se nesta temperatura por 3 min, novo aquecimento de 5°C/minuto até 230°C, mantendo-se nesta temperatura por 15 minutos. Fase móvel de hélio foi utilizada em modo split ratio 1:30, velocidade linear de 1,58 mL/minuto, pressão inicial de 127,6 kPa, em coluna RTX-WAX da marca Restek (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O tempo total de análise foi de 36 minutos. Juntamente com as amostras foi injetado um padrão de éster etílico de ácido oléico. O padrão foi preparado com 0,0158 g diluído em 100 mL de hexano (0,158 g/L).

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os ensaios iniciais de esterificação e transesterificação foram realizados simultaneamente e os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 1 e 2.

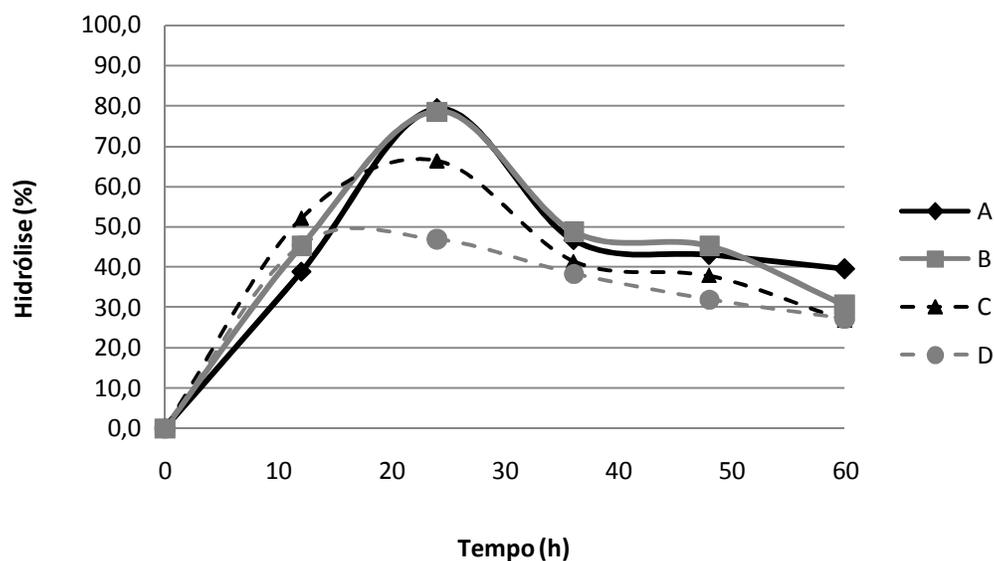


Figura 1 – Esterificação enzimática do hidrolisado de óleo de soja com etanol (A = 2,5%; B=5,0%; C=7,5% m/m de lipase LS e hidrólise prévia de 24 horas; D = 5,0% m/m de lipase LS e hidrólise prévia de 12 horas), com 15% m/m de água, 45°C e 210 rpm em frascos agitados.

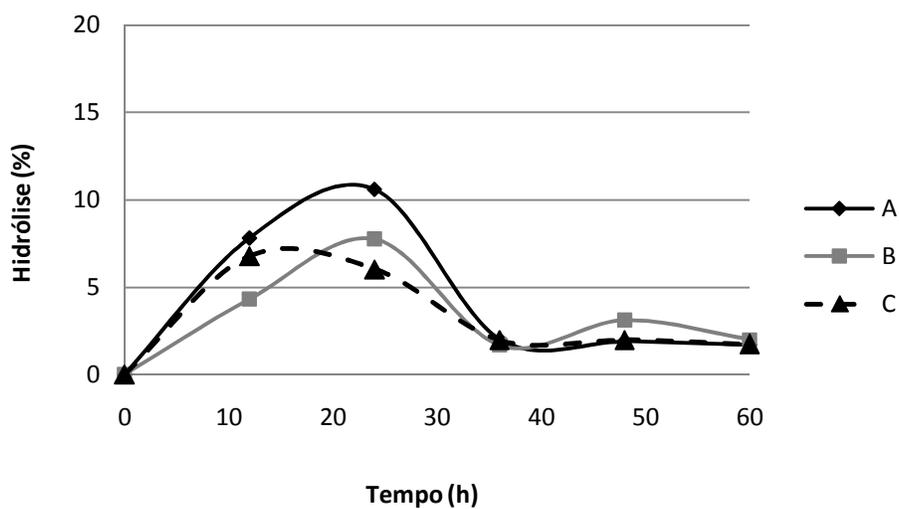


Figura 2 – Transesterificação enzimática de óleo de soja com etanol (A = 2,5%; B= 5,0%; C = 7,5% m/m de lipase LS) com 15% m/m de água, 45°C e 210 rpm em frascos agitados.

As Figuras 1 e 2 mostram como se comportou a concentração de ácidos graxos livres nos sistemas de hidrólise + esterificação e de transesterificação, respectivamente. Para o sistema com hidrólise prévia, nota-se que a concentração enzimática (variando entre 2,5 e 7,5% m/m de lipase LS) não apresentou diferenças consideráveis na concentração de ácidos graxos livres, sendo o perfil hidrolítico bastante semelhante. Nota-se, no entanto uma velocidade de reação maior tanto na formação como no consumo dos ácidos graxos no ensaio C (7,5% m/m), o que era esperado, uma vez que o aumento da concentração enzimática é um dos fatores que leva ao aumento da taxa de hidrólise, dentro da faixa em que a lipase LS mostra-se bastante solúvel no meio reacional.

Na comparação dos dois processos é possível perceber que a taxa de hidrólise reduz-se drasticamente na presença do etanol. Nos ensaios mostrados na Figura 2, nos quais o etanol foi adicionado no início do processo reacional, a quantidade de ácidos graxos livres detectados no meio reacional atinge no máximo a faixa dos 10%. Na comparação do ensaio D (hidrólise prévia de 12 horas) com os demais ensaios da Figura 1 (hidrólise prévia de 24 horas), nota-se que as taxas de hidrólise são menores ao longo do tempo de reação, pois a adição de etanol é realizada com uma concentração de ácidos graxos livres menor no meio reacional, no entanto por volta de 60 horas de processo parece haver uma condição próxima ao equilíbrio nos diferentes ensaios na faixa entre 30 a 40% de hidrólise residual.

A redução na concentração de ácidos graxos livres é verificada também nos ensaios nos quais se realiza apenas a hidrólise (capítulo 5, Figura 7). No entanto, nos ensaios das Figuras 1 e 2, a diminuição da concentração de ácidos graxos livres pode ser atribuída a reversão da hidrólise com a formação de triacilgliceróis ou ao processo de esterificação para formação de ésteres etílicos. A investigação da composição do meio reacional após a adição do etanol foi feita inicialmente por cromatografia de camada delgada. Nesta análise, detectou-se a presença dos ácidos graxos livres nas amostras, confirmando a análise titulométrica, porém não foi possível perceber a presença de ésteres etílicos de ácidos graxos.

Após a realização dos ensaios de esterificação e transesterificação, realizou-se um segundo experimento, com as mesmas condições de hidrólise e adição de etanol ao meio reacional a partir de 12 horas. Realizou-se ensaios na condição de razão molar de 1:5 e 1:10 (óleo:etanol), para verificar o efeito do etanol no processo e verificar a ação de esterificação da enzima, uma vez que no ensaio preliminar não foram detectados ésteres na análise de cromatografia em camada delgada.

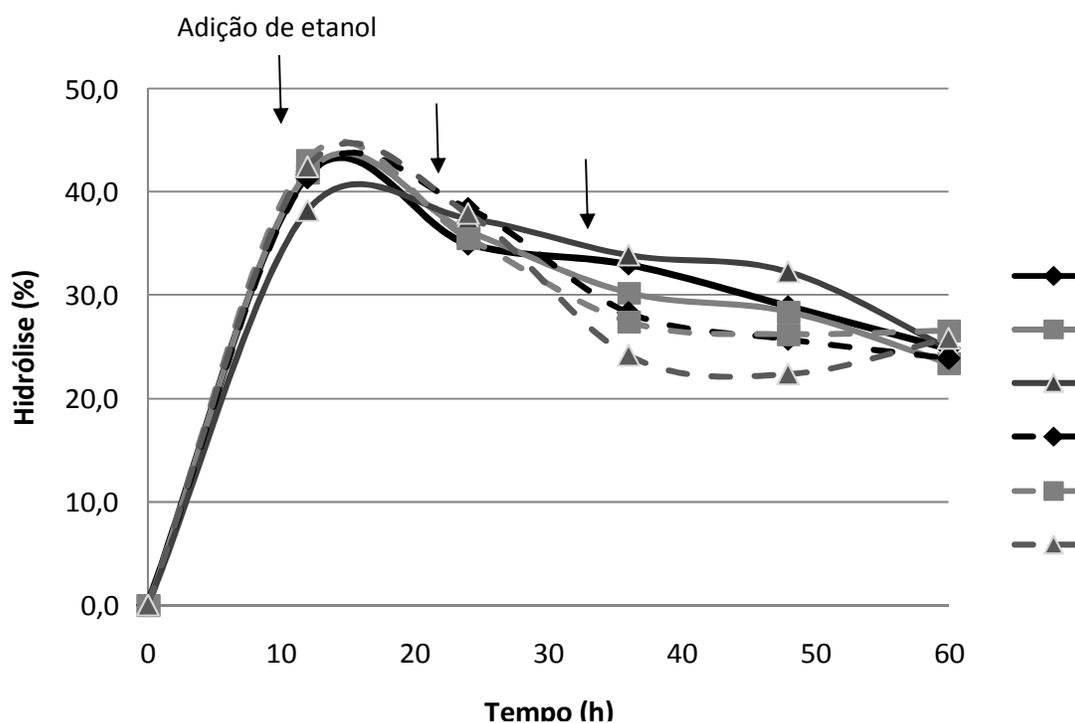


Figura 3 – Esterificação enzimática com óleo de soja e etanol (E1, E2 e E3 = 1:5 (óleo:etanol) e E4, E5 e E6 = 1:10 (óleo: etanol)) com 5% m/m de lipase LS (22 U/g óleo), 15% m/m de água, 45°C e 210 rpm em frascos agitados.

Os ensaios em triplicata mostrados na Figura 3 confirmam o perfil de hidrólise obtido nos ensaios anteriores, com diminuição da concentração de ácidos graxos livres após a adição de etanol, que neste caso se deu a partir de 12 horas de processo. A variação na concentração de etanol não mostrou diferença significativa entre as taxas de hidrólise, sendo que em praticamente todos os tempos analisados, os valores da taxa de hidrólise mais

ou menos o desvio padrão encontram-se na mesma faixa de valores. A composição das amostras ao longo do tempo reacional foram avaliadas por cromatografia gasosa e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.

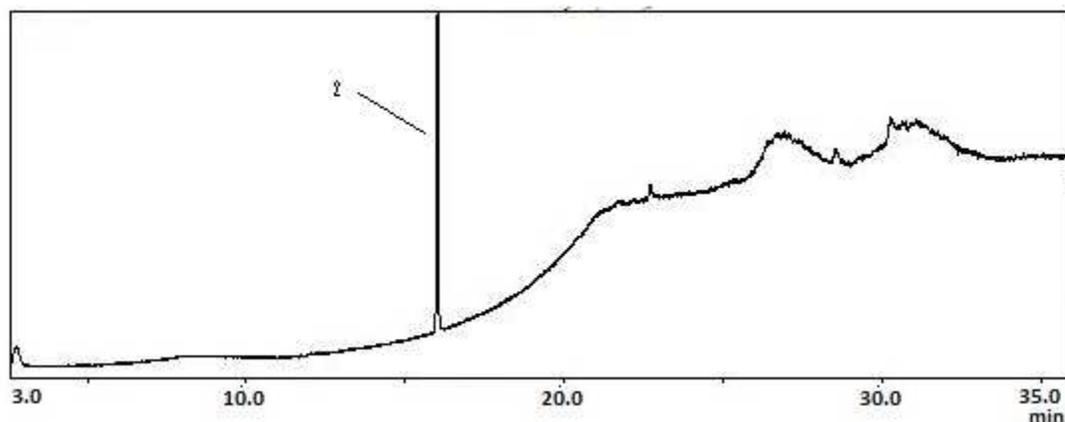


Figura 4a – Padrão de etil éster de ácido oléico

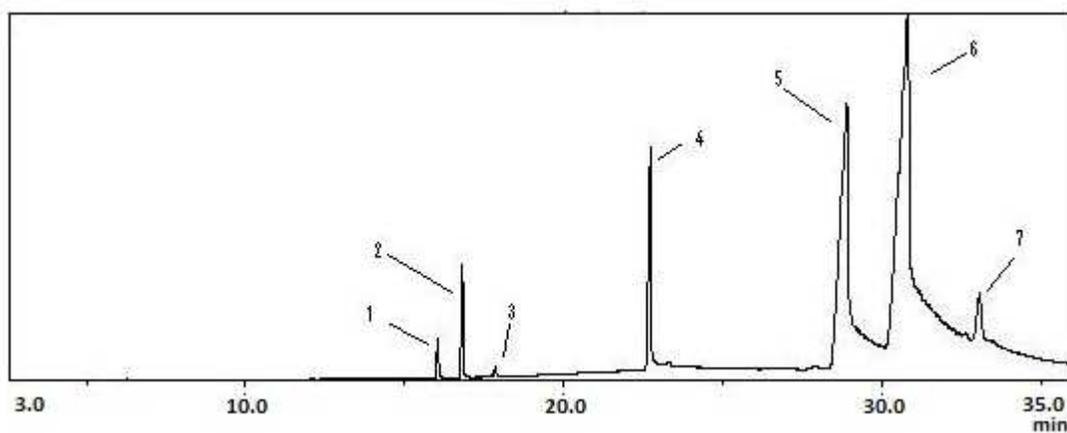


Figura 4b- Hidrólise enzimática do óleo de soja com 12 horas de reações

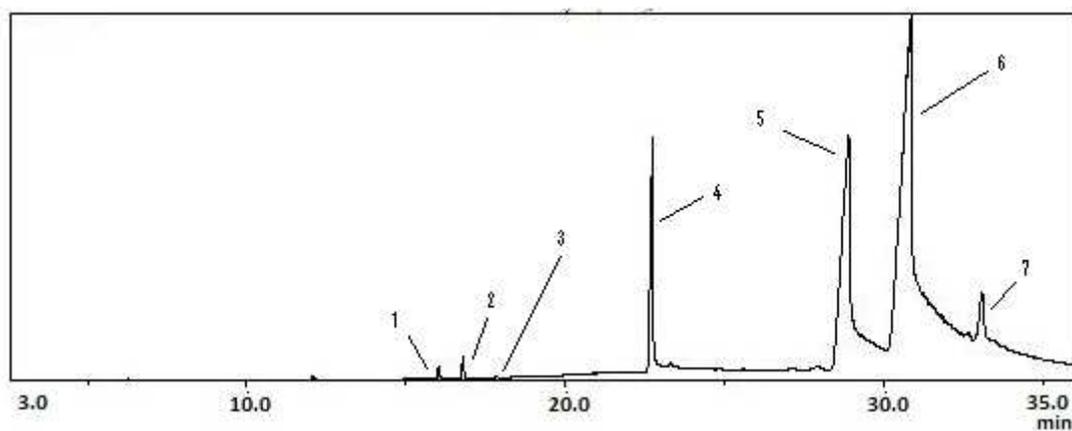


Figura 4c – Esterificação do hidrolisado do óleo de soja com etanol na razão molar 1:5 com 12 horas de reação

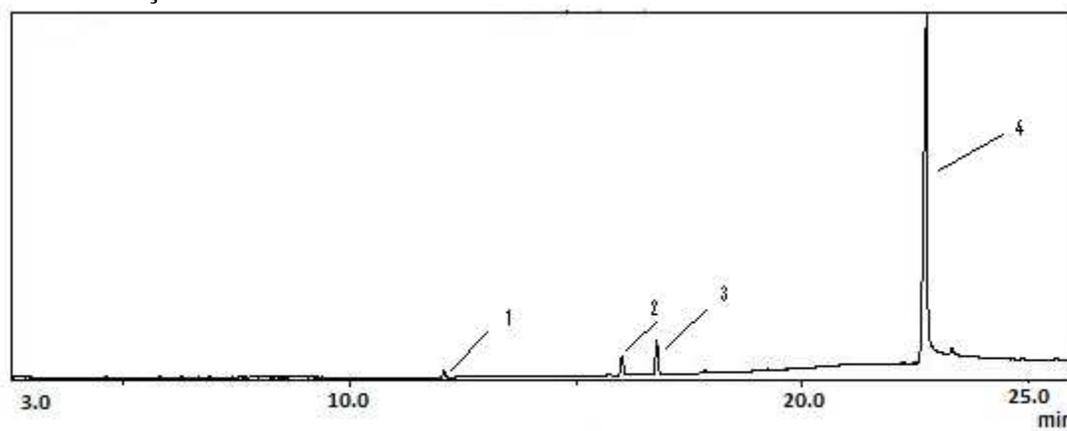


Figura 4d - Esterificação do hidrolisado do óleo de soja com etanol na razão molar 1:5 com 24 horas de reação

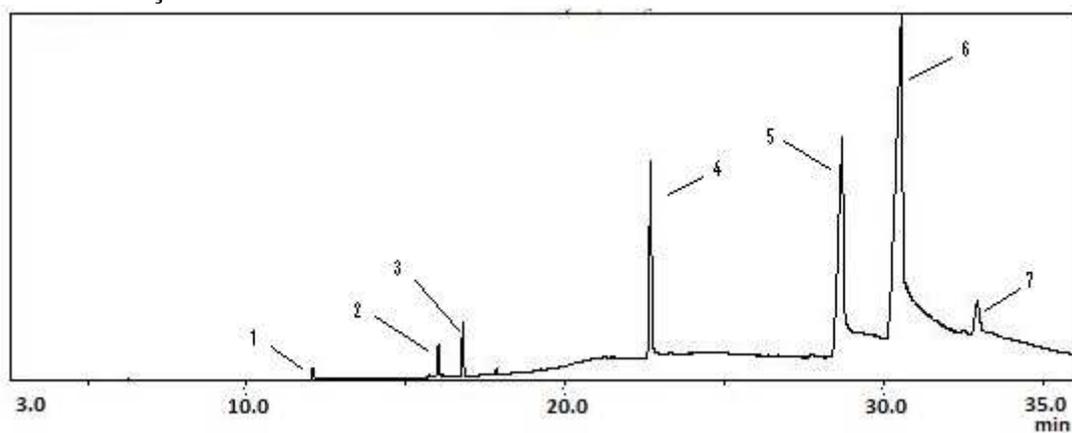


Figura 4e - Esterificação do hidrolisado do óleo de soja com etanol na razão molar 1:5 com 36 horas de reação

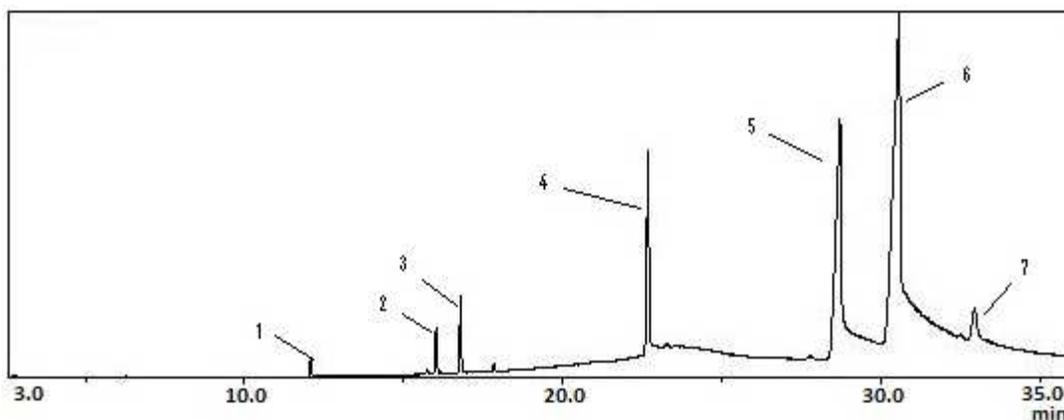


Figura 4f - Esterificação do hidrolisado do óleo de soja com etanol na razão molar 1:5 com 48 horas de reação

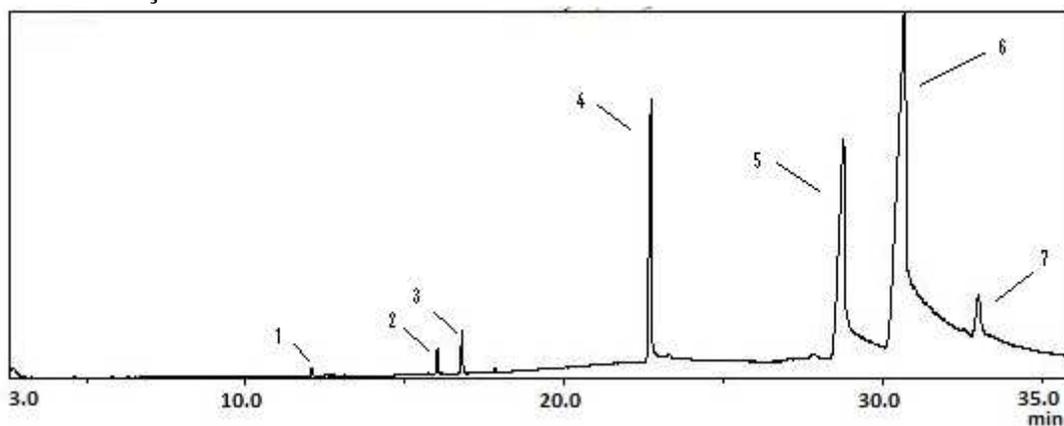


Figura 4g - Esterificação do hidrolisado do óleo de soja com etanol na razão molar 1:10 com 24 horas de reação

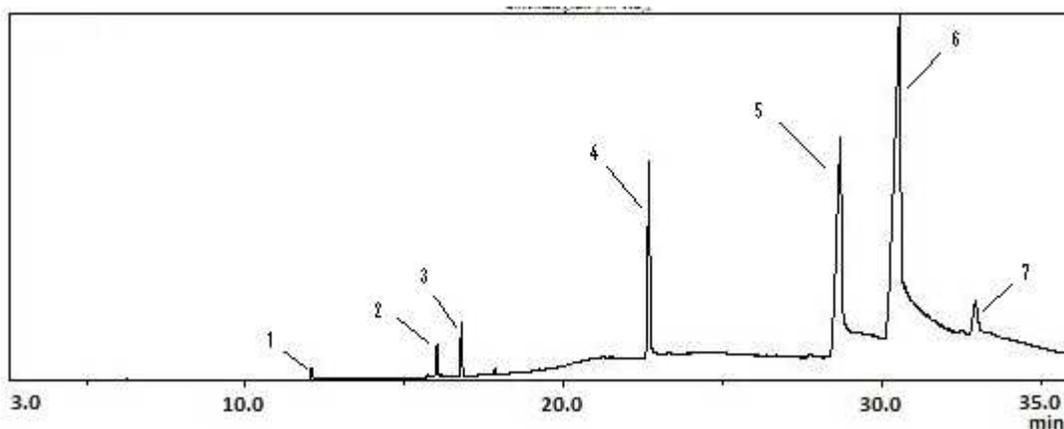


Figura 4h - Esterificação do hidrolisado do óleo de soja com etanol na razão molar 1:10 com 36 horas de reação

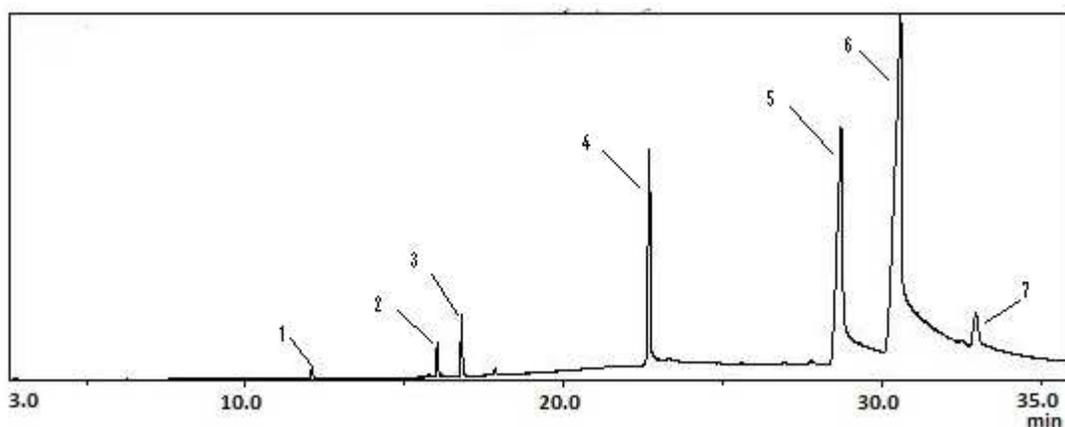


Figura 4i - Esterificação do hidrolisado do óleo de soja com etanol na razão molar 1:5 com 24 horas de reação

Figura 4 – Separação cromatográfica de ésteres etílicos de ácidos graxos e ácidos graxos presentes em amostras de hidrolisado de óleo de soja e hidrolisado de óleo de soja esterificado com etanol. Coluna: Restek RTX-WAX, 30 m x 0,25 mm; espessura do filme de 0,25  $\mu$ m; fase móvel: hélio a 1,58 mL/min; temperatura: 120°C por 2 min, 10°C/min até 180°C, 180°C por 3 min, 5°C/min até 230°C; detecção por espectrometria de massa, 250°C. Amostra: 1: etil éster de ácido palmítico; 2: etil éster de ácido oléico; 3: etil éster de ácido linoléico; 4: ácido palmítico; 5: ácido oléico; 6: ácido linoléico; 7: ácido linolênico.

De acordo com a Figura 4 foram identificados 7 picos correspondentes a ésteres etílicos e ácidos graxos presentes na amostra. A identificação foi feita por espectrometria de massa através dos valores  $m/z$  de cada substância comparada com a biblioteca do equipamento utilizado. Os valores obtidos de  $m/z$  da primeira fragmentação de cada composto foram: 284 (etil éster de ácido palmítico); 310 (etil éster de ácido oléico); 308 (etil éster de ácido linoléico); 256 (ácido palmítico); 264 (ácido oléico); 280 (ácido linoléico); 278 (ácido linolênico).

Tabela 1 – Composição relativa das amostras submetidas a hidrólise e esterificação do óleo de soja com etanol utilizando lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552.

| Substância <sup>1</sup> | Hidrólise | Esterificação      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------------------|-----------|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|
|                         | 12 h      | 12 h               |      | 24 h |      | 36 h |      | 48 h |      |
|                         |           | 1:5 <sup>(3)</sup> | 1:10 | 1:5  | 1:10 | 1:5  | 1:10 | 1:5  | 1:10 |
| EEAP (% <sup>2</sup> )  | 1,4       | 0,2                | -    | 0,2  | 0,3  | 0,6  | 0,6  | 0,7  | 0,6  |
| EEAO (%)                | 3,8       | 0,4                | -    | 0,5  | 1,0  | 1,6  | 1,6  | 2,0  | 1,6  |
| EEAL(%)                 | 0,3       | 0,8                | -    | 0,8  | 1,7  | 2,6  | 2,6  | 3,4  | 2,8  |
| AP(%)                   | 10,2      | 11,0               | -    | 11,6 | 14,2 | 11,4 | 11,0 | 10,9 | 12,0 |
| AO(%)                   | 33,7      | 31,9               | -    | 30,5 | 27,7 | 27,7 | 29,5 | 30,6 | 31,4 |
| AL(%)                   | 46,9      | 51,7               | -    | 52,7 | 50,6 | 52,0 | 51,0 | 48,5 | 47,5 |
| ALin(%)                 | 3,7       | 4,0                | -    | 3,7  | 4,4  | 4,2  | 3,8  | 3,9  | 4,0  |

<sup>1</sup> Substância identificada: EEAP = éster etílico de ácido palmítico; EEAO = éster etílico de ácido oléico; EEAL = éster etílico de ácido linoléico; AP = ácido palmítico; AO = ácido oléico; AL = ácido linoléico; ALin = ácido linolênico.

<sup>2</sup> Porcentagem relativa dos componentes analisados.

<sup>3</sup> 1:5 e 1:10 = razão molar óleo:etanol utilizada na esterificação.

A Tabela 1 indica que ao longo do processo reacional, as amostras apresentavam uma composição majoritária de ácidos graxos livres em oposição a baixa concentração de ésteres etílicos. O total de ésteres etílicos era de 5,5 % no início da esterificação (12 horas de hidrólise), este valor é maior do que o observado na maioria das amostras provenientes do processo de esterificação com adição de etanol. A menor quantidade relativa de ésteres etílicos após a adição do etanol demonstra que a enzima utilizada não apresenta ação de

esterificação nas condições avaliadas em relação ao total de ésteres identificados. Há uma variabilidade muito grande na ação hidrolítica e de esterificação de lipases de diferentes fontes. Qin et al. (2008) perceberam esta variabilidade ao avaliar seis diferentes lipases na transesterificação do óleo de soja com metanol, obtendo taxas de conversão de 5 até 30% conforme a lipase utilizada.

No entanto, ao observar separadamente os ésteres identificados, outras respostas podem ser percebidas. Em relação aos ésteres etílicos de ácido oléico (EEAO) e de ácido palmítico (EEAP) observa-se que há uma diminuição da quantidade relativa destes no meio reacional, indicando inclusive que houve uma hidrólise destes ésteres ao longo do processo avaliado. A quantidade de EEAO diminuiu de 3,8% para cerca de 2,0 e 1,6% após 60 horas de processo, enquanto a quantidade de EEAP diminuiu de 1,4% para 0,6%. Esta característica de hidrolisar ésteres de ácido oléico e ácido palmítico havia sido observada anteriormente para a lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 no estudo realizado por Bailargeon et al. (1989).

Por outro lado, observa-se um incremento na concentração de éster etílico de ácido linoléico (EEAL) que variou de 0,3% para um máximo de 3,4% após 60 horas de processo, ou seja, parece haver uma ação de esterificação, ainda que pequena, da lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 sobre o ácido linoléico, que não é ocorre para os ácidos palmítico e oléico. Sidebottom et al., (1991), haviam observado que uma lipase de *Geotrichum candidum* CMICC 335426 apresentava especificidade sobre ácidos graxos livres insaturados com dupla ligação na posição 9, que é o caso do ácido linoléico (ácido 9,12-octadecadienócio), característica esta também observada por Phillips et al. (1995). No entanto, no trabalho de Hlavsová et al. (2009) foi observada uma baixa especificidade da lipase *Geotrichum candidum* sobre triacilgliceróis de ácidos poliinsaturados. Outro trabalho apresenta características peculiares para a lipase de *Geotrichum candidum*, com uma ação de esterificação sobre ácidos graxos de cadeia média e longa com alcoóis secundários (Susumu et al., 1979).

A partir do padrão da análise dos cromatogramas, da concentração aplicada do padrão de éster de ácido oléico (0,158 g/L), das taxas de hidrólise obtidas na etapa prévia e do balanço estequiométrico do sistema foi possível estimar, de forma bastante aproximada, que a taxa de esterificação obtida ao final do processo foi da ordem de 2,0%, valor este muito reduzido em comparação a dados obtidos na literatura. O valor mais próximo a este encontrado na literatura foi obtido na transesterificação de óleo de soja com metanol utilizando lipase de *Candida rugosa*, com 5% de conversão (Qin et al., 2008).

Na comparação entre os ensaios utilizando razão molar 1:5 e 1:10 (óleo:etanol) não foi possível observar diferenças significativas entre a composição das amostras tanto em relação a concentração de ésteres etílicos quanto a de ácidos graxos livres, mantendo-se o mesmo padrão de distribuição destes compostos em todos os tempos analisados. Este resultado já havia sido demonstrado pela análise titulométrica mostrada na Figura 3.

Em relação à concentração relativa de ácidos graxos livres também não há diferença significativa de nenhum dos ácidos identificados ao longo do processo reacional. No entanto, ao se confrontar as áreas dos diferentes cromatogramas é possível verificar que a concentração total de ácidos graxos livres ao final do processo reacional é cerca de metade daquela observada após as 12 horas iniciais (hidrólise prévia), o que está de acordo com o que foi observado através da análise titulométrica, que indicou uma taxa de hidrólise da ordem de 40% após 12 horas, com uma redução para cerca de 20% após 60 horas de processo, de acordo com os dados apresentados na Figura 3.

Tanto os resultados em termos de composição relativa como de concentração total dos componentes mostraram concordância na comparação dos diferentes métodos analíticos utilizados. Os resultados das concentrações de ácidos graxos livres detectadas foram similares pelos métodos titulométrico e por cromatografia gasosa. Em relação aos ésteres etílicos, a baixa concentração detectada por cromatografia gasosa confirma o que foi visto na cromatografia de camada delgada, em que só foi possível detectar a presença dos ácidos graxos livres, mas não se observou a presença dos ésteres etílicos.

Os valores da concentração de ácidos graxos esperados para óleo de soja estão mostrados na tabela 2.

Tabela 2 – Concentração de ácidos graxos em óleo de soja

| ÁCIDOS GRAXOS              | ESTRUTURA | VALORES DE REFERÊNCIA (%) |
|----------------------------|-----------|---------------------------|
| -                          | C<14      | < 0,1                     |
| Ácido Mirístico            | C14:0     | < 0,5                     |
| Ácido Palmítico            | C16:0     | 7,0 - 14,0                |
| Ácido Palmitoleico         | C16:1     | < 0,5                     |
| Ácido Esteárico            | C18:0     | 1,4 - 5,5                 |
| Ácido Oléico (Ômega 9)     | C18:1     | 19,0 - 30,0               |
| Ácido Linoléico (Ômega 6)  | C18:2     | 44,0 - 62,0               |
| Ácido Linolênico (Ômega 3) | C18:3     | 4,0 - 11,0                |
| Ácido Araquídico           | C20:0     | < 1,0                     |
| Ácido Eicosenóico          | C20:1     | < 1,0                     |
| Ácido Behênico             | C22:0     | < 0,5                     |

Valores de Referência RDC nº 482, de 23/09/1999, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA

Dos principais ácidos graxos presentes no óleo de soja – palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico, todos foram detectados na análise realizada nas faixas de concentração esperada, exceto o ácido esteárico, que não foi detectado. A não detecção do ácido esteárico deve estar relacionada à especificidade da enzima e a análise realizada. A análise por cromatografia gasosa nas condições realizadas consegue identificar ésteres de ácidos graxos e ácidos graxos livres, mas não consegue identificar triacil, diacil e monoacilgliceróis. É provável que a enzima não consiga hidrolisar triacilglicerol de ácido esteárico e este pode estar presente no hidrolisado em uma das formas que a metodologia utilizada não consegue detectar.

#### 4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesta fase do trabalho foi possível perceber, que dentro das condições avaliadas, a lipase de *Geotrichum candidum* NRLLY-552 não foi capaz de realizar a esterificação do hidrolisado obtido na etapa preliminar e nem de realizar a transesterificação do óleo de soja com etanol. Na segunda reação, a presença do etanol desde o início do processo reacional também diminuiu significativamente a ação hidrolítica da enzima em comparação ao que foi obtido no sistema apenas hidrolítico. No entanto, parece haver uma ação de esterificação desta lipase sobre o ácido linoléico, havendo uma esterificação da ordem de 2%, sendo a concentração de éster etílico de ácido linoléico presente ao final do processo cerca de dez vezes maior do que o valor inicial. O que pode indicar certa especificidade da lipase por ácidos graxos insaturados com ligação dupla na posição 9, como é o caso do ácido linoléico. A concentração de água não foi avaliada nesta fase do estudo e isto também pode ter contribuído para a baixa atividade de esterificação da lipase utilizada. A utilização de peneiras dessecantes para reduzir a atividade de água no sistema pode alterar significativamente a dinâmica e os resultados no sistema avaliado.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC n°. 482, 23/09/1999.
2. Al-Zuhair, S.; Ramachandran, K.B. e Hasan, M. Effect of enzyme molecules; covering of oil-water interfacial area on the kinetic of oil hydrolysis. *Chemical Engineering Journal*, 139, 3,540-548, (2008).
3. Al-Zuhair, S.; Jayaraman, K.V.; Krishnan, S.; Chan, W-H. The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. *Biochemical Engineering Journal*, 30, 212-217, (2006).

4. Andrade, G.S.S.; Freitas, L.; Oliveira, P.C.; Castro, H.F. Screening, immobilization and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolysis of babassu oil. *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic*. doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.031, (2012).
5. Baillargeon, M.W.; Bistline, R.G.; Sonnet, P.E. Evaluation of strains of *Geotrichum candidum* for lipase production and fatty acid specificity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30, 1, 92-96, (1989).
6. Giraldo, L.; Moreno-Piraján, J.C. Lipase supported on mesoporus materials as a catalyst in the synthesis of biodiesel from *Persea Americana mill oil*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 77, 32-38, (2012).
7. Hama, S.; Yamaji, H.; Fukumizu, T.; Numata, T.; Tamalampudi, S.; Kondo, A.; Noda, H. and Fukuda, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochemical Engineering Journal*, 34, 3, 273-278, (2007).
8. Hlavsová, K.; Zarevúcka, M; Wimmer, Z.; Macková, M.; Sovová, H. *Geotrichum candidum* 4013: Extracellular lipase versus cell-bound lipase from the single strain. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61, 3-4, 188-193, (2009).
9. Lee, M; Lee, J.; Lee, D.; Cho, J.; Kim, S.; Park, C. Improvement of enzymatic biodiesel production by controlled substrate feeding using silica gel in solvent free system. *Enzyme and Microbiol Technology*, 49, 4, 402-406, (2011).
10. Phillips, A.; Pretorius, G.H.J; van Rensburg, H.G. Molecular characterization of a *Galactomyces geotrichum* lipase, another member of the cholinesterase/lipase family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1252, 2, 305-311, (1995).
11. Qin H, Yan X, Yun T, Dong W. Biodiesel Production Catalyzed by Whole-Cell Lipase from *Rhizopus chinensis*. *Chinese Journal of Catalysis*, 29, 1, 41-46, (2008).

12. Raita, M.; Laothanachareon, T.; Champreda, V; Laosiripojana, N. Biocatalytic esterification of palm oil fatty acids for biodiesel production using glycine-based cross-linked protein coated microcrystalline lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 73,1-4,74-79, (2011).
13. Rodrigues, R.C.; Ayub, M.A.Z. Effects of the combined used of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. *Process Biochemistry*, 46,3,682-688, (2011).
14. Shimada, Y.; Watanabe, Y.; Sugihara, A; Tominaga, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17, 3-5, 133-142, (2002).
15. Sidebottom, C.M.; Charton, E.; Dunn, P.P.J.; Mycock,G.; Davies, C.; Sutton, J.L.; Macrae, A.R.; Slabas, A.R. *Geotrichum candidum* produces several lipases with markedly different substrate specificities. *European Journal of Biochemistry*, 202, 2, 485-491, (1991).
16. Su, E.; Wei, D. Improvement in lipase-catalyzed methanolysis of triacylglycerols for biodiesel production using a solvent engineering method. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 55, 3-4, 118-125, (2008).
17. Susumu, O.; Mieko, I.; Yoshio, T. Synthesis of various kinds of esters by four microbial lipases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Lipids and Lipid Metabolism*, 575, 1, 156-165, (1979).
18. Wang, Y.; Cae, X. Enzymatic synthesis of fatty acid ethyl esters by utilizing camellia oil soapstocks and diethyl carbonate. *Bioresource Technology*, 102, 22, 10173-10179, (2011).
19. Watanabe, Y.; Shimada, Y; Sugihara, A.; Tominaga, Y. Stepwise ethanolysis of tuna oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88, 66, 622-626, (1999).

20. Zheng, D.; Hanna, M.A. Preparation and properties of methyl esters of beef tallow. *Bioresource Technology*, 57, 2, 137-142, (1996).

## CAPÍTULO VII – CONCLUSÃO GERAL

A partir da análise dos resultados obtidos ao longo deste trabalho foi possível chegar às seguintes conclusões:

- **Estudo da produção de lipase por diferentes micro-organismos** - a avaliação de seis micro-organismos produtores de lipase (*Geotrichum candidum* NRRLY-552, *Geotrichum* sp., leveduras silvestres AY3, AAV1, AC02, *Fusarium oxysporum*) indicaram que todos apresentam capacidade de produzir lipases, no entanto apenas os fungos da gênero *Geotrichum* levaram a obtenção de níveis de atividade lipolítica adequados para a aplicação neste trabalho. O fungo *Geotrichum candidum* NRRLY-552 produziu  $(17,0 \pm 0,3)$  U/mL de lipase após 48 horas de fermentação nas mesmas condições otimizadas em trabalho anterior (Maldonado, 2006). Já o fungo *Geotrichum* sp. alcançou uma produção de lipase de  $(35,2 \pm 0,8)$  U/mL após 32 horas de fermentação utilizando como condições ótimas: 1 área circular de  $0,78 \text{ cm}^2$  contendo esporos do micro-organismo, 50 mL de volume de meio de inóculo, 12 horas de incubação do inóculo, meio de fermentação contendo 15% m/v de água de maceração de milho e 0,6 % m/v de óleo de soja, pH inicial de 5,0, temperatura de 30°C e 150 rpm em frascos agitados.
- **Estudo da purificação da lipase de *Geotrichum candidum*** – foram avaliadas as condições de purificação parcial da lipase de *Geotrichum candidum* por três métodos: precipitação com sulfato de sódio, precipitação com etanol e concentração direta. Em todos os casos, foi aplicada liofilização a enzima como forma de reduzir a quantidade de água e aumentar a concentração da enzima. Os resultados demonstraram que tanto a precipitação com sulfato de sódio como a precipitação com etanol proporcionaram uma alta atividade lipolítica nos preparados enzimáticos obtidos, variando de 400 a 900 U/g, com fatores de concentração entre 30 e 66% e fator de recuperação entre 56 a 162%. O método de purificação parcial por sulfato de sódio mostrou maiores valores dos fatores de recuperação enquanto que o método por etanol mostrou-se melhor quanto aos valores dos fatores de

concentração. A purificação parcial por etanol pode ser bastante interessante, caso se possa trabalhar com fatores de recuperação menores, uma vez que o processo é bem mais rápido do que o processo com sulfato de sódio e o resíduo gerado (uma solução hidro-alcoólica) pode ser reaproveitada no processo de obtenção de biodiesel.

- **Estudo da imobilização da lipase de *Geotrichum candidum*** – avaliou-se quatro diferentes suportes para imobilização da enzima (alginato de cálcio, nióbio-grafite, zeólita e Celite). Em todos os casos, faz-se necessário avaliar melhores condições para imobilização enzimática da lipase, sendo os resultados de imobilização com Celite o que se mostraram mais promissores dentre os suportes avaliados.
- **Estudo da hidrólise enzimática de óleos vegetais** – foi possível obter uma condição de processo que levasse a um alto nível de hidrólise enzimática do óleo de soja pela lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552. Sob as condições de 5,0% m/m de lipase LS (equivalente a 22,0 U/ g óleo); 15,0% m/m de água; 45°C e 210 rpm em frascos agitados foi possível obter-se uma taxa de hidrólise de  $(77 \pm 3)\%$  após 24 horas de processo. Verificou-se ainda que a temperatura de processo pode ser ampliada até 55°C com considerável manutenção da atividade lipolítica. A enzima mostrou-se eficaz também na hidrólise enzimática, com os mesmos níveis de hidrólise, para os óleos de milho, girassol e canola, indiciando uma versatilidade na atuação da enzima sobre diferentes substratos. A enzima apresentou também resultados na mesma ordem de grandeza em reator encamisado, mostrando ser possível ampliar a escala de produção do hidrolisado alterando-se o sistema reacional. As taxas de hidrólise obtidas são adequadas a aplicação do hidrolisado para a produção de biodiesel por esterificação com alcoóis de cadeia curta, apresentam níveis similares a trabalhos relatados na literatura, com a vantagem de se utilizar baixas concentrações de água e de enzima e de se utilizar uma enzima apenas parcialmente purificada, o que reduz significativamente os custos do processo.

- **Estudo da esterificação e transesterificação enzimática do óleo de soja** – na avaliação da capacidade da enzima de realizar os processos de esterificação do hidrolisado de óleo de soja e da transesterificação do óleo de soja não se obteve resultados significativos quanto à taxa de formação de ésteres etílicos de ácidos graxos (biodiesel), dentro das condições avaliadas, que atingiu cerca de 2,0% apenas. No entanto, o sistema desenvolvido pode ser melhorado avaliando-se outras condições reacionais e a utilização de outra lipase com maior poder de esterificação do que a lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552. Como resultado promissor desta etapa há a indicação de que a lipase estudada apresenta uma especificidade por realizar a esterificação do ácido linoléico com etanol, cuja concentração aumentou em 5 vezes no meio reacional ao longo do processo de esterificação.

De uma forma global, o estudo realizado aponta que o sistema proposto para a produção de biodiesel a partir de óleos vegetais é promissor. Os custos de produção da enzima são baixo devido à utilização de resíduos agro-industriais e a etapa de purificação parcial é simples. Os resultados do sistema hidrolítico mostram taxa de hidrólise bastante elevada, o que é essencial para a obtenção do biodiesel no sistema reacional com duas etapas ( hidrólise + esterificação). Apesar dos resultados baixos quanto a esterificação, pode-se a partir do sistema de hidrólise otimizado investigar melhores condições para a realização da etapa de esterificação, tais como: remoção da água residual da etapa prévia de hidrólise, aumento na concentração enzimática, associação com outras lipases de maior atividade de esterificação, avaliação de outras faixas de concentração de etanol e utilização de enzimas imobilizadas que tenham maior estabilidade na presença do etanol.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Procurar micro-organismos que apresentem níveis de produção de lipases maiores;
- Selecionar enzimas com maior atividade de esterificação;
- Aplicar o processo de purificação parcial com utilização do etanol e reaproveitar o resíduo da purificação enzimática no processo de produção do biocombustível;
- Estudar melhores condições para imobilização de lipases e aplicar lipase imobilizadas aos sistemas de hidrólise, esterificação e transesterificação dos óleos vegetais;
- Realizar associação de lipase com melhor atividade de esterificação com a lipase de *Geotrichum candidum* a fim de potencializar os resultados do sistema hidrólise + esterificação;
- Realizar a ampliação de escala tanto na produção da enzima como nos sistemas de hidrólise, esterificação e transesterificação;
- Estabelecer condições para obtenção de elevadas taxas de formação de ésteres etílicos de ácidos graxos (biodiesel).

## ANEXO I – TRABALHOS PUBLICADOS AO LONGO DA REALIZAÇÃO DESTE PROJETO

1. Maldonado, R.R.; Panciera, A.L.; Macedo, G.A.; Mazutti, M.A. Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. **Improvement of lipase production from *Geotrichum* sp. in shaken flasks.** *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, doi: 10.2298/CICEQ 120124022M, 2012.
2. Maldonado, R.R.; Fogaça, F.M.; Macedo, G.A.; Rodrigues, M.I. **Hidrólise e esterificação de óleo de soja catalisadas por lipase por *Geotrichum candidum* com vistas à produção de biodiesel.** IX Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática (ENZITEC), Rio de Janeiro, RJ, Nov/2010.
3. Ramos, G.G.; Maldonado, R.R.; Macedo, G.A.; Rodrigues, M.I. **Estudo da Imobilização da Lipase de *Geotrichum candidum*.** XVII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, Campinas, SP. Set/2009.
4. Fogaça, F.F.; Maldonado, R.R.; Macedo, G.A.; Rodrigues, M.I. **Estudo da Hidrólise de Óleo de Soja por Lipase de *Geotrichum candidum* como Etapa Preliminar para Produção de Biodiesel.** XVII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, Campinas, SP. Set/2009.
5. Maldonado, R.R.; Fogaça, F.M.; Ramos, G.G.; Macedo, G.A.; Rodrigues, M.I. **Different reactional systems to enzymatic hydrolysis of soybean oil as preliminary phase to biodiesel production.** *New Biotechnology*, vol. 25S, p. 251, Barcelona, Spain, Set, 2009.
6. Maldonado, R.R.; Masiero, F.F.; Ramos, G.G.; Macedo, G.A.; Rodrigues, M.I. **Enzymatic hydrolyze of soy oil using lipase by *Geotrichum candidum*.** 5<sup>th</sup> International Technical Symposium of Food Processing and Food Quality Management, Potsdam, Germany, Set/2009.

7. Panciera, A.L.; Maldonado, R.R.; Macedo, G.A.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. **Produção de Lipase por *Geotrichum* sp. utilizando resíduos industriais.** XVI Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, Campinas, SP, Set/2008.
8. Maldonado, R.R.; Panciera, A.L.; Macedo, G.A.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. **Lipase production by *Geotrichum* sp. using industrial residue as nitrogen source.** Foz do Iguaçu, PR, 2008. XXXVII Brazilian Congress of Agricultural Engineering and the International Livestock Symposium – ILES VIII, Foz do Iguaçu, PR, Set/2008.
9. Maldonado, R.R.; Panciera, A.L.; Macedo, G.A. Rodrigues, M.I. **Avaliação e seleção de micro-organismos produtores de lipase.** VIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, Rio de Janeiro, RJ, Ago/2008.