República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019000255-7 A2

(22) Data do Depósito: 07/01/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 28/07/2020

(54) Título: MÉTODO PARA IMOBILIZAR LIPASES EM SUPORTES ORIUNDOS DA INDÚSTRIA TÊXTIL DURANTE A FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

(51) Int. Cl.: C12N 1/12; C12N 9/20; C12R 1/80.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE TECNOLOGICA FEDERAL DO PARANA; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.

(72) Inventor(es): ALESSANDRA MACHADO BARON; PATRÍCIA SALOMÃO GARCIA; MILENA MARTINS ANDRADE; DANILO RIBEIRO BARNABE JUNIOR; NADIA KRIEGER.

(57) Resumo: MÉTODO PARA IMOBILIZAR LIPASES EM SUPORTES ORIUNDOS DA INDÚSTRIA TÊXTIL DURANTE A FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO A presente invenção refere-se a um processo de produção, por fermentação no estado sólido, e imobilização de lipases utilizando como suportes, tecidos oriundos da indústria têxtil. Neste processo, o suporte é misturado ao meio de cultivo sólido. Devido à umidade do meio, as lipases extracelulares produzidas adsorvem no suporte têxtil adicionado ao meio sólido. Ao final do processo de fermentação, o suporte contendo as enzimas adsorvidas pode ser empregado diretamente em reações de biocatálise sem preparos prévios. O objetivo da invenção é aproveitar um resíduo da indústria têxtil para imobilizar lipases ou enzimas em geral, agregando valor ao produto final que seria descartado no meio ambiente. Além disso, visa minimizar as etapas que envolvem um processo de imobilização por adsorção física convencional, a saber: extração da enzima; imobilização; separação da enzima imobilizada da solução inicial; secagem da enzima imobilizada. O método proposto mostrou-se mais eficaz em termos de redução de tempo, dispensa na utilização de alguns equipamentos e manutenção na eficiência catalítica da enzima em relação ao método convencional.

MÉTODO PARA IMOBILIZAR LIPASES EM SUPORTES ORIUNDOS DA INDÚSTRIA TÊXTIL DURANTE A FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente solicitação de Patente de Invenção se refere ao método de produção, por fermentação no estado sólido, e imobilização de lipases utilizando suportes (tecidos) oriundos da indústria têxtil com aplicação na área de biotecnologia/biocatálise.

[002] O método propõe reduzir etapas até a obtenção do biocatalisador imobilizado, em suporte inerte, e o aproveitamento de um resíduo oriundo da indústria têxtil.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[003] As lipases (triacilglicerol éster hidrolase, EC 3.1.1.3 - número de acordo com a Comissão de Enzimas (do inglês ***E**nzyme **C**omission*), disponível em: http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/) têm grande aplicação porque são enzimas que catalisam inúmeras reações dentre elas, a hidrólise de ésteres de ácidos graxos e reações de síntese (in vitro e em um ambiente aquo-restrito) como esterificação, transesterificação (alcoólise e acidólise), interesterificação e aminólise (DUARTE et al., 2016; AOUF et al., 2014; KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998).

[004] As aplicações têm destaque na síntese de produtos de interesse nas áreas clínica, nutricional, ambiental, industrial e biotecnológica, como por exemplo: a) na indústria óleo-química, para a hidrólise e interesterificação regiosseletiva de óleos e gorduras e síntese de biosurfactantes; b) na síntese de poliésteres biodegradáveis; c) na indústria farmacêutica, na síntese de intermediários de produtos biologicamente ativos, como o naxopreno e ibuprofeno e na resolução de misturas racêmicas, como a síntese do atenolol, medicamento usado no tratamento de hipertensão; d) na indústria de alimentos: síntese de aromas, síntese do aspartame e na maturação de queijos; e) na indústria de cosméticos: na síntese de ésteres como o palmitato de isopropila (emoliente em produtos para a pele e óleos para banho) e f) produção de

biodiesel (AOUF et al., 2014; SINGH e MUKHOPADHYAY, 2012; SINGH et al., 2008).

[005] Lipases, proteases e outros metabólitos são produzidos por dois tipos básicos de fermentação: Fermentação Submersa (FS) e Fermentação em Estado Sólido (FES). Quando a enzima é produzida por FS, para posterior utilização em biocatálise, a enzima presente no extrato aquoso pode ser liofilizada (enzima em pó) ou imobilizada em um suporte inerte. Quando a produção ocorre por FES, para aplicar as enzimas em biocatálise ou biotransformação, pode-se utilizar, em alguns casos, o próprio sólido fermentado (SF) ou a extração da enzima do SF é realizada, seguida da imobilização em suporte inerte. Sendo possível ainda com a enzima extraída do SF, a liofilização.

[006] Quando se utilizam enzimas imobilizadas, as vantagens estão associadas especialmente à reutilização do biocatalisador, permitindo a separação dos produtos do meio reacional de forma fácil e a possibilidade de melhorar a eficiência catalítica da enzima (WANG e HSIEH, 2008; SABBANI et al., 2006).

[007] Dentre as vantagens em se utilizar o SF diretamente no meio reacional, o SF pode atuar como suporte para a enzima, eliminando a necessidade da etapa de extração e imobilização em outro suporte (PI0704791-6 A2, FERNANDES et al., 2007; SALUM, 2010; REINEHR, 2015). Entretanto, nem sempre a utilização do SF diretamente ao meio reacional é viável. Nos casos onde o SF contém metabólitos que podem interferir nas reações (resíduos de lipídeos como sementes oleaginosas, por exemplo) produzindo subprodutos indesejáveis e para os casos onde a produção enzimática é baixa.

[008] Para os casos onde a utilização do SF diretamente ao meio reacional não é viável, a extração da enzima e posterior imobilização ou liofilização (REINEHR, 2015) se fazem necessárias. Menoncin et al. (2009) por exemplo, optaram por produzirem lipases de *Penicillium verrucosum* em FES utilizando o farelo de soja como meio, mas não utilizaram o SF diretamente ao meio reacional. Ao invés disso, realizaram a extração da enzima do sólido fermentado (solução tampão fosfato pH 7) e posteriormente a imobilização (adsorção) no suporte Accurel®.

[009] Dentre os métodos de imobilização, a adsorção física é muito utilizada por ser tratar de um método simples, de baixo custo, pois não há a necessidade de ativação do suporte. Além disso, o método promove pouca alteração na estrutura conformacional da enzima. Neste método, as enzimas são imobilizadas no suporte por meio de interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações iônicas (LEE, LIN E MOU, 2009).

[0010] Quando o processo de imobilização enzimática é realizado, independente da escolha do método (adsorção, ligação covalente, encapsulação, ligação cruzada, etc), algumas etapas são necessárias até a obtenção do catalisador imobilizado, a saber: produção da enzima (FES ou FS); extração da enzima; imobilização (enzima e suporte em contato por um determinado tempo, para adsorção); separação da enzima imobilizada da solução inicial; secagem da enzima imobilizada.

[0011] Analisando esses casos, onde a utilização do SF não é viável surgiu a ideia proposta no presente pedido de patente de invenção “MÉTODO PARA IMOBILIZAR LIPASES EM SUPORTES ORIUNDOS DA INDÚSTRIA TÊXTIL DURANTE A FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO”. A inovação está no processo simultâneo de produção por FES e imobilização, pois o suporte (tecido) é introduzido conjuntamente ao meio de fermentação sólido. Exemplificando, o meio de fermentação sólido (que contém os nutrientes necessários para o desenvolvimento do microrganismo) é misturado com um suporte inerte. O microrganismo irá se desenvolver e produzir enzimas que ficarão adsorvidas tanto no sólido fermentado como no suporte inerte. Por consequência, ao final do processo de fermentação, o suporte contendo as enzimas adsorvidas, é separado, podendo ser empregado diretamente em reações de biocatálise. Com isso, a realização das etapas para o procedimento de imobilização citadas anteriormente (extração da enzima; imobilização; separação da enzima imobilizada da solução inicial; secagem da enzima imobilizada) seriam dispensadas.

[0012] A limitação do método está no tipo de suporte que pode ser adicionado em conjunto com o meio de fermentação sólido. Alguns suportes inertes não são

viáveis por diferentes motivos, materiais na forma de pó, por exemplo, dificultaria a separação do SF; assim como materiais que se degradam durante o processo de esterilização via autoclave, necessária antes do inicio de qualquer processo fermentativo. A escolha pelo suporte proposto neste pedido de patente (tecido de algodão) baseou-se no fato do material ser resistente, não estar na forma de pó e por se tratar de um resíduo oriundo da indústria têxtil. Para se ter uma ideia, o Brasil é o quinto maior produtor de têxteis do mundo (IEMI, 2014), no entanto toda essa produção é responsável por gerar mais de 175 mil toneladas de resíduos da indústria têxtil ao ano. Além disso, de acordo com a Abit, mais de 90% dos restos de tecido são descartados incorretamente (SINDITÊXTIL, 2012).

[0013] Tendo em vista a preocupação com os descartes da indústria têxtil e analisando a possibilidade de realizar um procedimento de imobilização de lipases não convencional, a finalidade desta patente é reduzir etapas durante a imobilização de enzimas e contribuir para o reaproveitamento retalhos têxteis agregando valor ao produto final.

ESTADO DA TÉCNICA

[0014] No estado da técnica, existem alguns documentos com algumas similaridades ao presente pedido e que serão apresentados nesta seção.

[0015] A PI0704791-6 A2, intitulada: PROCESSO DE SÍNTESE DE ÉSTERES COM LIPASES IMOBILIZADAS NO SUBSTRATO SÓLIDO FERMENTADO, trata de um processo de síntese de ésteres através de reações de esterificação, transesterificação (alcoólise e acidólise) e interesterificação catalisada por lipases. Neste processo, as lipases são produzidas por fermentação no estado sólido (FES) e o substrato fermentado obtido (SF) (contendo a enzima e o microrganismo) é adicionado diretamente ao meio reacional para catálise da reação, eliminando as etapas de extração, purificação e imobilização da lipase. O custo de produção ainda é reduzido através da utilização de resíduos agroindustriais como substratos. A principal diferença é que os inventores propuseram a utilização do sólido fermentado (contendo enzima e microrganismo) diretamente no meio reacional. No presente pedido, adicionou-

se conjuntamente ao meio de cultivo, um suporte inerte (tecido) para que as enzimas produzidas pudessem ser imobilizadas simultaneamente durante a fermentação no estado sólido.

[0016] Outros processos foram encontrados, porém sem guardar relação com o pedido em questão. Os inventores propuseram um método de produção de um fertilizante na fermentação no estado sólido no pedido WO2015100513 (A1), enquanto a patente MX9800035 (A) descreve o processo de imobilização convencional, portanto nenhuma semelhança entre os trabalhos.

DESCRIÇÃO DA ABORDAGEM DO PROBLEMA TÉCNICO E DIFERENCIAL INOVATIVO

[0017] Para esclarecer a diferença entre o processo de imobilização **convencional** e o **proposto neste pedido de patente**, as etapas para os dois casos serão descritas a seguir:

[0018] Para o processo de produção e imobilização de lipases/enzimas **convencional**, diferentes etapas são necessárias como:

a) inóculo do microrganismo;
b) produção da lipase/enzima por fermentação sólida ou líquida;
c) extração da lipase/enzima pós fermentação;
d) imobilização da lipase/enzima no suporte sólido
e) separação da lipase/enzima imobilizada no suporte sólido.

[0019] Para o **processo proposto**, o meio de cultivo estaria conjuntamente com o suporte inerte. O microrganismo é inoculado no meio contendo farelo da semente de girassol (meio de cultivo) e o tecido. Desta forma, será capaz de se desenvolver, graças ao meio de cultivo e produzirá enzimas extracelulares que irão adsorver no tecido (imobilização). Ao final do período de fermentação, tem-se enzima imobilizada em suporte inerte e sólido fermentado. Por consequência, as etapas (c), (d) e (e) seriam dispensadas. Portanto, o processo proposto possibilitaria redução de custos para a produção do catalisador, contribuiria com o gerenciamento eco-amigável de resíduos sólidos, além de poder ser aplicado para imobilizar diversas enzimas.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0020] O processo **convencional** e o **processo proposto** neste pedido de patente de invenção serão descritos através de fluxogramas, no qual estão representadas:

FIGURA 1: Método convencional de imobilização.

FIGURA 2: Método proposto neste pedido de patente.

[0021] Os símbolos, triângulo, losango e círculo, nas Figuras 1 (método convencional) e 2 (proposto neste pedido), representam respectivamente: Meio de cultivo sólido, suporte inerte e enzimas provenientes de algum microrganismo.

[0022] As etapas da produção da enzima e imobilização em suporte sólido (processo de imobilização **convencional** (A) representado na Figura 1) estão descritos a seguir:

[0023] a) Inóculo do microrganismo (I): adição de uma pequena quantidade do microrganismo produtor da enzima de interesse.

[0024] b) Produção da enzima por FES (II): enzimas podem ser produzidas por fermentação submersa ou sólida. Quando a produção por fermentação sólida é a realizada, ao final da fermentação obtém-se o sólido fermentado (SF). Este material contém as enzimas adsorvidas, mas nem sempre pode ser utilizada diretamente ao meio reacional como comentado anteriormente. Neste caso, as etapas descritas a seguir são necessárias.

[0025] c) Extração da enzima (III): é a retirada da enzima do sólido fermentado, por meio de uma solução extratora. Normalmente esta etapa requer otimização do tempo de extração, do tipo de solução extratora e da temperatura durante o processo de extração.

[0026] d) mobilização (IV): obtendo a enzima extraída em solução, inicia-se o processo de imobilização que consiste em deixar a solução contendo a enzima em contato com o suporte sólido inerte sob agitação. Para este processo, normalmente estuda-se o tempo de contato enzima-suporte, a concentração de enzima e a temperatura do processo de imobilização.

[0027] e) Filtração para separação da enzima imobilizada (V): após a imobilização o suporte contendo enzima é separado da solução remanescente e seco em dessecador.

[0028] Para o proposto neste pedido, “MÉTODO PARA IMOBILIZAR LIPASES EM SUPORTES ORIUNDOS DA INDÚSTRIA TÊXTIL DURANTE A FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO” (Figura 2), o suporte inerte oriundo do descarte da indústria têxtil (no caso específico, foi testado o tecido de algodão cru) foi introduzido no início da fermentação antes do pré inóculo (I). Assim, à medida que um microrganismo utilizar o meio de cultivo para seu desenvolvimento (no caso específico, utilizou-se farelo de semente de girassol com casca triturada) irá produzir enzimas/lipase extracelulares, essas enzimas adsorvem no suporte inerte (tecido), sendo, portanto imobilizadas (II). Na produção máxima de enzima (para o caso específico, 6 dias) a fermentação é interrompida, o suporte inerte (tecido) e o sólido fermentado (SF) são separados e podem ser aplicados como catalisadores pois ambos possuem as enzimas adsorvidas (III). Porém, para os casos onde o SF não for viável (descrito anteriormente), pode-se utilizar apenas a enzima imobilizada no suporte inerte obtida conjuntamente ao sólido fermentado. Observa-se, portanto, que quando uma enzima é imobilizada **pelo método convencional (A)**, **cinco etapas** são necessárias. Para o **método proposto neste pedido de patente (B)**, em **três etapas** seria possível obter a mesma enzima imobilizada no mesmo suporte.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0029] Para a realização do processo proposto é necessário: (1) o microrganismo produtor da enzima de interesse; (2) meio de cultivo que permita o desenvolvimento específico do microrganismo bem como a produção da enzima; (3) suporte inerte resistente à esterilização por autoclave e (4) ambiente climatizado.

[0030] Com relação a (1), utilizou-se o fungo *Penicillium corylophilum* anteriormente estudado como produtor de lipases (BARON et al., 2004).

[0031] Os meios de cultivo (2) mais empregados para produção de lipases são os provenientes da agroindústria como farelo de semente de girassol (utilizado

no exemplo demonstrado neste pedido de patente), de soja, de trigo, de arroz, de cevada, bagaço de cana de açúcar, entre outros. As frações granulométricas do meio podem ou não ser controladas (depende de cada microrganismo) dependendo essencialmente do resultado com relação à produção da enzima de interesse. A umidade da fermentação deve ser controlada no início do processo, pois está associada diretamente com o crescimento do microrganismo e por consequência com a produção da enzima. Para este pedido de patente, a umidade do meio de cultivo foi de 55% (m/m) com tampão fosfato pH 7,0.

[0032] Nesta etapa (3) é necessária a seleção de um suporte inerte que seja resistente à esterilização em autoclave, pois o suporte deve ser esterilizado juntamente com o meio de cultivo. O tecido de algodão cru (resíduo da indústria têxtil), por exemplo, é conveniente para o processo proposto. O meio de cultivo e o suporte inerte devem permanecer no mesmo recipiente até o fim da fermentação. Para os testes, o processo foi realizado em escala laboratorial, em erlenmeyers de 250 mL, porém para escalas industriais, reatores podem ser utilizados. Para verificar se houve a imobilização da enzima no suporte inerte durante o processo realizado simultaneamente à produção da enzima, é necessário um procedimento de dosagem de atividade enzimática. Para lipases, a hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (pNPP) com a presença do catalisador é um dos métodos mais empregados (Winkler e Stuckmann, 1979).

[0033] Para atestar que o **método proposto** (B) resultaria em uma enzima com eficiência catalítica semelhante àquela obtida pelo **método convencional** (A) de imobilização, todas as etapas descritas na Figura 1 (método convencional) também foram realizadas. Assim, os dois preparados enzimáticos (Enzima imobilizada pelo método convencional e Enzima imobilizada pelo método proposto) foram testados quanto a eficiência catalítica na hidrólise do pNPP.

Protocolo para a imobilização convencional (A)

I) Produção de lipases por fermentação sólida

[0034] Utilizou-se farelo de semente de girassol (granulometria entre 0,8 e 2,0 mm de diâmetro) umedecido com tampão fosfato pH 7,0, com umidade entre 50-60%. Em seguida, adicionou-se suspensão de esporos do fungo *Penicillium*

corylophilum aos frascos de pré-inóculo. Os frascos inoculados foram incubados em estufa a 29 °C por 144 h (pico máximo de atividade lipolítica, segundo resultados anteriores).

II) Extração da enzima do sólido fermentado

[0035] A enzima foi extraída do material fermentado com água destilada. A mistura foi agitada por 1 h a 180 rpm e em seguida filtrada em retalhos de algodão. O extrato foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 xg. O sobrenadante obtido foi utilizado para determinação da atividade enzimática (hidrólise do pNPP).

III) Imobilização de lipases em resíduo da indústria têxtil

[0036] Após a extração das lipases, a atividade foi dosada e em seguida, adicionou-se porções do suporte (algodão cru). A imobilização, por adsorção, ocorreu conforme o método proposto por Al-Duri e Yong (1999). Sob agitação (180 rpm, 25°C), o suporte e a solução enzimática ficaram em contato por 24 horas. Em seguida, o sobrenadante foi separado e os suportes, contendo as lipases imobilizadas, foram secos em dessecador para dosagem da atividade enzimática de ambos.

Protocolo para a imobilização durante a fermentação no estado sólido (B)

[0037] Para o processo proposto neste trabalho, utilizou-se farelo de semente de girassol (granulometria entre 0,8 e 2,0 mm de diâmetro) e tecido de algodão umedecidos com tampão fosfato pH 7,0, com 50-69% de umidade. Em seguida, ao meio de cultivo já contendo o suporte inerte (tecido de algodão), adicionou-se suspensão de esporos. Os frascos inoculados foram incubados em estufa a 29 °C por 144 h. Após a fermentação, o suporte (tecido de algodão) contendo as enzimas imobilizadas foram separados do meio de cultivo (SF) e armazenados em refrigerador para dosagem da atividade enzimática de ambos.

Determinação da atividade lipolítica: Método da hidrólise do pNPP em meio aquoso

[0038] Para a determinação da atividade lipolítica utilizou-se o método da hidrólise do *p*NPP em meio aquoso. O método foi inicialmente descrito por Winkler e Stuckmann (1979) sendo modificado por Krieger (1995). Baseia-se na

hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) pela enzima, em meio aquoso contendo como surfactantes a goma arábica e o Triton X-100. A liberação do *p*-nitrofenol, de coloração amarela é seguida a 410 nm.

[0039] Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que promove a liberação de 1 µmol de *p*NP (*p*-nitrofenol) por minuto. A atividade enzimática foi calculada a partir do coeficiente de absortividade molar do *p*nitrofenol, obtido a partir de uma curva de calibração do *p*-nitrofenol nas mesmas condições do ensaio. O coeficiente de absortividade molar do *p*NP em pH 7,0 ($8{,}31.10^3$ L mol^{-1} cm^{-1}) foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a absorbância obtida na leitura. A determinação da atividade foi realizada a 37°C.

[0040] A dosagem da atividade enzimática (pNPP aquoso, descrito anteriormente) após a imobilização enzimática é importante pois demonstra se a enzima está ativa no suporte após o processo de imobilização. Para a imobilização convencional (A) a atividade foi de 26 ± 3 U g^{-1}. Este valor significa que 26 µmol do éster foram hidrolisados por min e por 1 g do suporte contendo as lipases. Para o processo onde se utilizou as lipases imobilizadas durante a fermentação no estado sólido (B), proposto como inovador, a atividade foi de 33 ± 8 U g^{-1}. Considerando o desvio padrão, pode-se considerar que a atividade para ambos os processos foi semelhante. Porém, quando se considera a redução de etapas e de utilização de equipamentos adicionais na obtenção da enzima imobilizada no processo (B), pode-se considerar que a adaptação do processo convencional para o proposto é vantajosa, pois a enzima manteve seu potencial catalítico na condição proposta.

[0041] Exemplificando, para o processo convencional (A) são necessárias, 144 horas para a fermentação (utilização de estufa), 1 hora de extração (utilização de shaker, centrífuga e acessórios da centrífuga), 24 horas de imobilização (utilização de shaker e sistema de filtração), 24 horas de secagem (utilização de dessecador). Para o “MÉTODO PARA IMOBILIZAR LIPASES EM SUPORTES ORIUNDOS DA INDÚSTRIA TÊXTIL DURANTE A FERMENTAÇÃO NO

ESTADO SÓLIDO” (B) seriam necessárias somente as 144 horas de fermentação e somente a utilização de estufa.

[0042] Vale ressaltar ainda que a ideia não está direcionada, neste momento, para produtividade enzimática, pois a produção pode ser alterada através de outras formas mantendo o método proposto neste pedido de patente. Por exemplo, é possível empregar outros microrganismos distintos do que foi utilizado, que produzam enzimas distintas das lipases bem como em quantidades diferentes. Além disso, a produção pode ser alterada usando outros meios de fermentação, outros suportes inertes, ou seja, condições de cultivos distintos dos que foram empregados.

Referências

Aouf, C.; Durand, E.; Lecomte, J.; Figueroa-Espinoza, M-C.; Dubreucq, E.; Fulcrand, H.; Villeneuve, P. The use of lipases as biocatalysts for the epoxidation of fatty acids and phenolic compounds. *Green Chem*. 16, 1740 -1754, 2014.

Al-Duri, B.; Yong, Y.P. Lipase immobilisation: an equilibrium study on lipases immobilised on hydrophobic and hidrophilic/ hydrophobic supports. *Biochem. Eng. J***.**, 4, 207-215, 1999.

Baron, A. M.; Sarquis, M. I. M.; Baigorí, M.; Mitchell, D. A.; Krieger, N. A comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillum coryophilum* in water-restricted environments. *J. Mol. Catalysis* B: Enzymatic, v. 34, p. 35-32, 2004.

Duarte, J. G.; Leone-Ignacio, K.; da Silva, J.A.C.; Fernandez-Lafuente, R. Freire, D.M.G. Rapid determination of the synthetic activity of lipases/esterases via transesterification and esterification zymography. *Fuel*, 177, 123–129, 2016.

Fernandes, M.L.M.; Saad, E.B.; Meira, J.A; Ramos, L.P; Krieger, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media**.** *J. Mol. Catal. B: Enz.*, 44, 1, 8-13, 2007.

IEMI (INSTITUTO DE ESTUDOS E MARKETING INDUSTRIAL). *Relatório setorial da indústria têxtil brasileira*. São Paulo: IEMI, 14, 11, 2014.

Kazlauskas, R.J, Bornscheuer, U.T. Biotransformations with Lipases. In: Rehm H-J, Reed G, editors. *Biotechnology: biotransformations* I, 2th ed., vol. 8a. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; p. 37 - 191, 1998.

Krieger, N. *Produção, Purificação e Caracterização de Lipases de Penicillium citrinum*. Curitiba, 1995. 260 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Lee, C.; Lin, T.; Mou, C.; Mesoporous materials for encapsulating enzymes; *Nano Today* 2009, 4, 165.

Menoncin, S; Domingues, N. M.; Freire, D. M. G.; Oliveira, J.V.; Luccio, M-Di.; Treichel, H.; Oliveira, D. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29, 440-443, 2009.

Reinehr, C.O. *Produção de lipases de Aspergillus spp. por fermentação em estado sólido seguida de separação e concentração utilizando membranas*. 149 f, Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim/RS, 2015.

Sabbani, S.; Hedenström, E.; Nordin, O. The enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase is influenced by the particle size of the immobilising support material Accurel. *J. Mol. Catal. B: Enzym*., 42, 1-2, 1-9, 2006.

Salum, T. F C. *Produção e Imobilização de lipases Burkholderia cepacia LTEB11 Para Síntese de ésteres etílicos.* 131 f, Tese (Doutorado em Ciência Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SINDITÊXTIL. Retalho fashion é destaque de evento na Rio+20. Disponível em: <http://www.sinditextilsp.org.br/noticias/retalho-fashion-%C3%A9-destaque-de-evento-na-rio+20>. Acesso em: 14 de agosto de 2018.

Singh, M.; Singh, S.; Singh, R.S.; Chisti, Y.; Banerjee, U.C. Transesterification of primary and secondary alcohols using *Pseudomonas aeruginosa* lipase. *Bioresource Technol*., 99, 2116–2120, 2008.

Singh, A.K.; Mukhopadhyay, M. Overview of Fungal Lipase: A Review*. Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 2, 486–520, 2012.

Wang, Y.; Hsieh, Y.L. Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes. *J. Membrane Science*, 309, 73–81, 2008.

Winkler, U.K.; Stuckmann, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhace the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol***.**, 138, 3, 663-670, 1979.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO PARA IMOBILIZAR LIPASES EM SUPORTES ORIUNDOS DA INDÚSTRIA TÊXTIL DURANTE A FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO caracterizado por realizar um procedimento de imobilização diferente do convencional, sendo a obtenção do biocatalisador imobilizado em suporte inerte, oriundo de resíduos da indústria têxtil, simultâneo à produção de enzimas, por fermentação sólida.

2. MÉTODO PARA IMOBILIZAR LIPASES EM SUPORTES ORIUNDOS DA INDÚSTRIA TÊXTIL DURANTE A FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO, de acordo com a reinvindicação 1, caracterizado por utilizar preferencialmente suportes oriundos de resíduos da indústria têxtil ou outro material inerte de baixo custo.

3. MÉTODO PARA IMOBILIZAR LIPASES EM SUPORTES ORIUNDOS DA INDÚSTRIA TÊXTIL DURANTE A FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO, de acordo com a reinvindicação 1, caracterizado por utilizar preferencialmente o microrganismo *Penicillium corylophilum* para produção de lipases, em meio de fermentação sólido.

4. MÉTODO PARA IMOBILIZAR LIPASES EM SUPORTES ORIUNDOS DA INDÚSTRIA TÊXTIL DURANTE A FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO, de acordo com a reinvindicação 1, caracterizado por utilizar preferencialmente nas condições do processo de fermentação e imobilização simultâneos, a proporção de 10 g do substrato (meio de cultivo), 1 g de suporte inerte (preferencialmente um resíduo), tampão ou água para umidade entre 50-60%, 1 mL de solução de esporos do microrganismo, sendo mantidos até a produção máxima de enzima em estufa à temperatura específica para o microrganismo empregado.

Figura 1

Figura 2

RESUMO

“MÉTODO PARA IMOBILIZAR LIPASES EM SUPORTES ORIUNDOS DA INDÚSTRIA TÊXTIL DURANTE A FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO”

A presente invenção refere-se a um processo de produção, por fermentação no estado sólido, e imobilização de lipases utilizando como suportes, tecidos oriundos da indústria têxtil. Neste processo, o suporte é misturado ao meio de cultivo sólido. Devido à umidade do meio, as lipases extracelulares produzidas adsorvem no suporte têxtil adicionado ao meio sólido. Ao final do processo de fermentação, o suporte contendo as enzimas adsorvidas pode ser empregado diretamente em reações de biocatálise sem preparos prévios. O objetivo da invenção é aproveitar um resíduo da indústria têxtil para imobilizar lipases ou enzimas em geral, agregando valor ao produto final que seria descartado no meio ambiente. Além disso, visa minimizar as etapas que envolvem um processo de imobilização por adsorção física convencional, a saber: extração da enzima; imobilização; separação da enzima imobilizada da solução inicial; secagem da enzima imobilizada. O método proposto mostrou-se mais eficaz em termos de redução de tempo, dispensa na utilização de alguns equipamentos e manutenção na eficiência catalítica da enzima em relação ao método convencional.